

# **Zeit- und polarisationsaufgelöste Multiphotonenmikroskopie**

**- Bildgebende Fluoreszenzlebensdauermessungen und  
Zweifarb-Zweiphotonen-Anisotropiemessungen -**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Stefan Gerd Denicke  
aus Celle

1. Referent: Professor Dr. Karl-Heinz Gericke

2. Referent: Professor Dr. Peter Jomo Walla

eingereicht am: 27.01.2010

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.03.2010

Druckjahr 2010

# Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

Denicke S, Ehlers J-E, Niesner R A, Quentmeier S, Gericke K-H 2007 Steady-state and time-resolved two-photon fluorescence microscopy: A versatile tool for probing cellular environment and function *Phys. Scr* **76**.

Denicke S, Quentmeier S, Ehlers J-E, Gericke K-H 2009 Applications of the time-resolved two-colour two-photon excitation of UV fluorophores using femtosecond laser pulses *Phys. Scr.* **80** 048105-048105.

Quentmeier S, Denicke S, Ehlers J-E, Niesner R A, Gericke K-H 2008 Two-color two-photon excitation using femtosecond laser pulses *J. Phys. Chem. B* **112** 5768–73

Quentmeier S, Denicke S, Gericke K-H 2009 Two-Color Two-Photon Fluorescence Laser Scanning Microscopy *J. Fluoresc.* **19** 1037–43.

## Berichte

Denicke S, Gericke K-H 2008, Abschlussbericht BMBF-Projekt „Beschleunigung komplexer Bioanalytik – Multiexponentielles dynamisches 3D-tau-Mapping in vitro und in vivo“ FKZ 0313412C (Teilbericht TU Braunschweig).

## Tagungsbeiträge

Denicke S, Niesner R A, Peker B, Rustenbeck I, Gericke K-H: Noniterative Biexponential Fluorescence Lifetime Imaging of NAD(P)H in MIN6-cells. (Poster) Microscience 2006, London (2006).

Denicke S, Niesner R A, Peker B., Rustenbeck I, Gericke K-H: Fluorescence Lifetime Imaging of NAD(P)H in MIN6-cells – Information about cellular Information about cellular metabolism. (Poster) DPG-Tagung 2007, Regensburg (2007).

Denicke S, Niesner R A, Peker B, Rustenbeck I, Gericke K-H: Fluorescence Lifetime Imaging of NAD(P)H in MIN6-cells. (Poster) Photons Live 2007, Saarbrücken, (2007).

Quentmeier S, Quentmeier C, Denicke S, Ehlers J-E, Walla P J, Gericke K-H: Monitoring protein digestion without labeling by using Time Resolved Two-Color Two-Photon excitation. (Poster) Microscience 2008, London (2008).

Denicke S, Herbrich S, Shertin P, Smolin A G, Vasyutinskii O S, Gericke, K-H: Complete polarization studies of UV-fluorophores by time resolved two-color two-photon excitation. (Poster) 11<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications of Fluorescence (MAF 11), Budapest (2009).



# Abkürzungen

<b>2C2P</b>	Zweifarben-Zweiphotonen (Two-Color Two-Photon)
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>APD</b>	Avalanche Photo-Diode
<b>BCECF</b>	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>FAD</b>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
<b>FLIM</b>	Fluorescence Lifetime Imaging
<b>FWHM</b>	Full Width at Half-Maximum (Halbwertsbreite)
<b>IRF</b>	Instrument Response Function
<b>KIC</b>	$\alpha$ -Ketoisocapronsäure
<b>MCP</b>	Multichannel plate
<b>NA</b>	Numerische Apertur
<b>NAD(P)H</b>	(Phosphoryliertes) reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
<b>PMT</b>	Photomultiplier
<b>PPD</b>	2,5-Diphenyl-1,3,4-oxadiazol
<b>PTP</b>	<i>para</i> -Terphenyl
<b>OPE</b>	Einphotonenanregung
<b>SHG</b>	Second Harmonic Generation
<b>TCSPC</b>	Time Correlated Single Photon Counting
<b>TPE</b>	Zweiphotonenanregung
<b>TrPE</b>	Dreiphotonenanregung



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>7</b>
2.1	LICHT ALS ELEKTROMAGNETISCHE STRAHLUNG .....	7
2.2	ABSORPTION UND FLUORESZENZ .....	11
2.3	MULTIPHOTONENMIKROSKOPIE .....	16
2.3.1	<i>Zweifarb-Zweiphotonen-Mikroskopie (2C2P)</i> .....	20
2.4	ANISOTROPIE .....	24
2.4.1	<i>Zeitabhängige Anisotropiemessungen</i> .....	29
2.5	POLARISATIONSABHÄNGIGKEIT DER ZWEIPHOTONENABSORPTION .....	31
2.5.1	<i>Anisotropie der Zweiphotonen angeregten Fluoreszenz</i> .....	38
<b>3</b>	<b>NAD(P)H und Calcium in <math>\beta</math>-Zellen .....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>55</b>
4.1	BIOLOGISCHE PROBEN (MIN6-ZELLEN, PANKREAS) .....	55
4.2	LÖSEMittel UND FARBSTOFFE .....	57
4.3	BENUTZTE PROGRAMME .....	57
4.4	MEßMETHODEN .....	58
4.4.1	<i>Time-Gated Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)</i> .....	58
4.4.2	<i>Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC)</i> .....	59
4.5	EXPERIMENTELLER AUFBAU FÜR BIOLOGISCHE MESSUNGEN .....	61
4.6	EXPERIMENTELLER AUFBAU 2C2P-ANISOTROPIE-MESSUNGEN .....	66
4.7	AUSWERTEMETHODEN FLIM .....	73
4.7.1	<i>Levenberg-Marquardt (LM)</i> .....	74
4.7.2	<i>Prony-Methode</i> .....	74
4.7.3	<i>Global Fitting</i> .....	78
4.8	EINFLUSS DER INSTRUMENT RESPONSE FUNCTION (IRF) .....	79
4.9	AUSWERTUNG ANISOTROPIE-MESSUNGEN .....	86
4.9.1	<i>Mikroskop-Messungen</i> .....	86
4.9.2	<i>M-Parameter-Berechnung</i> .....	87
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>95</b>
5.1	NAD(P)H-MESSUNGEN .....	95
5.1.1	<i>Stimulierungsmessungen mit Glucose</i> .....	98
5.1.2	<i>Stimulierungen mit KIC</i> .....	108
5.2	CALCIUM-MESSUNGEN .....	112
5.2.1	<i>Fura-2</i> .....	112
5.2.2	<i>Andere Calciumindikatoren</i> .....	120
5.3	ANISOTROPIEMESSUNGEN (VORUNTERSUCHUNGEN) .....	130
5.4	POLARISATIONABHÄNGIGKEIT DER 2C2P-ABSORPTION .....	133
5.4.1	<i>2C2P-Absorption</i> .....	134
5.4.2	<i>2C2P-Anisotropiemessungen</i> .....	138
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>153</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>161</b>
<b>8</b>	<b>APPENDIX .....</b>	<b>169</b>
8.1	SOURCE-CODE VON PROGRAMMEN .....	169
8.2	TENSORFORMALISMUS VASYUTINSKII .....	181



# 1 EINLEITUNG

Multiphotonenspektroskopie wird seit der Erfindung der ersten Rubin-Laser in den 60er Jahren zur Erforschung spektroskopischer Phänomene eingesetzt. Während in den ersten Jahrzehnten hauptsächlich die Absorption aromatischer Moleküle in Kristallform, Lösungen und Gasphasen gemessen wurde [1], machte die Verfügbarkeit neuartiger Lasersysteme auch *in vivo* Untersuchungen von Molekülen in biologischen Systemen, d.h. Zellen und Organen möglich, ohne diese zu schädigen [2]. In dieser Arbeit werden Messungen präsentiert, die die ganze Bandbreite der Möglichkeiten der Multiphotonenspektroskopie mit Titan:Saphir Lasersystemen widerspiegeln: Von der Charakterisierung elektronisch angeregter Zustände von Molekülen durch Polarisationsmessungen bis hin zu *in vivo* Untersuchungen des Metabolismus von  $\beta$ -Zellen aus der Bauchspeicheldrüse durch zeitaufgelöste Multiphotonenmikroskopie.

Zunächst soll der Hintergrund der Polarisationsmessungen erläutert werden und dann auf die zeitaufgelösten Messungen in Zellen eingegangen werden.

Aufgrund der simultanen Wechselwirkung zweier Photonen mit einem Molekül gibt es bei der Multiphotonenspektroskopie im Vergleich zu herkömmlicher Einphotonenspektroskopie eine ganze Reihe zusätzlicher Informationen, die man über ein Molekül gewinnen kann. Für zentrosymmetrische Moleküle sind bei der Einphotonenanregung nur ganz bestimmte elektronische Zustände erreichbar. Die Anregung anderer Zustände ist aus Symmetriegründen verboten, sie lassen sich aber teilweise mit Zweiphotonenspektroskopie untersuchen. Für eine spektroskopische Charakterisierung und das Verständnis der Struktur und Reaktion von vielatomigen Molekülen ist es nötig, möglichst die energetische Lage und Symmetrie aller Zu-

stände zu kennen. Auch quantentheoretische Rechnungen können anhand solcher Messungen auf ihre Genauigkeit überprüft werden.

Im Gegensatz zur Einphotonenspektroskopie ist bei der Multiphotonenspektroskopie mit neuartigen Lasersystemen die spektroskopische Charakterisierung (d.h. u.a. Bestimmung der Symmetrie des angeregten Zustands) nicht nur in Kristallen sondern auch bei Messungen in Lösung möglich. Dies bedeutet eine erhebliche experimentelle Vereinfachung [3].

In den 70er Jahren wurde von McClain [4] postuliert, dass sich durch eine Reihe von zweiphotonen-induzierter Fluoreszenzmessungen von Molekülen in Lösung, bei denen sich alle drei Photonen (zwei Anregungsphotonen, ein Emissionsphoton) durch ihre Wellenlänge und ihre Polarisation unterscheiden, Informationen über die elektronischen Übergänge in einem Molekül in Lösung ermitteln lassen. Er nannte dies „Komplette Polarisationsmessungen“, wegen der maximal extrahierbaren Information. In dieser Arbeit soll der etwas präzisere Begriff Zweifarben-Zweiphotonen(2C2P)-Anisotropie-Messungen verwendet werden. McClain berechnete, dass sich solche Fluoreszenz-anisotropiedaten durch maximal sieben unabhängige Parameter beschreiben lassen, aus deren Verhältnissen sich Informationen über die Symmetrie eines angeregten Zustands, die Größe der involvierten Absorptionsdipolmomente und die relative Lage des Emissionsdipolmoment ergeben. In den folgenden Jahren wurde dieses von theoretischer und experimenteller Seite mehrmals aufgegriffen. Es gelang jedoch nie solche Messungen komplett durchzuführen. McClain und andere führten Teilerperimente durch, indem sie nur die 2C2P-Absorption, aber nicht die Polarisation der Fluoreszenz maßen [5]. Andere arbeiteten nur mit identischen Photonen [6–8]. Die ersten 2C2P-Teilerperimente mit kurzen Pikosekundenpulsen wurden von Lakowicz [9] präsentiert und kürzlich das erste 2C2P-Experiment mit Femtosekundenpulsen eines Titan:Saphir Lasers [10]. Auf Basis dieser grundlegenden Experimente wurde im Rahmen dieser Arbeit ein 2C2P-System für ein komplettes Polarisationsexperiment verwirklicht und die entsprechenden Auswertemethoden entwickelt.

Die Messung der 2C2P-Anisotropie der Fluoreszenz stellt eine hohe experimentelle Herausforderung dar. Zum einen werden für die genaue Messung der Anisotropie zum Zeitpunkt der Anregung kurze Pulse und schnelle ( $<300$  ps FWHM) Detektoren benötigt, zum anderen erfordert die zeitliche und räumliche Synchronisation der beiden zu absorbierenden Photonen einen komplexen Messaufbau. Die hier präsentierten Messungen stellen, soweit es bekannt ist, die ersten realisierten kompletten Polarisationsexperimente dar. Sie wurden exemplarisch an den drei UV-Fluorophoren *para*-Terphenyl (PTP), 2,5-Diphenyl-1,3,4-oxadiazol (PPD)

und Indol durchgeführt. Insbesondere PTP und PPD zeichnen sich durch eine hohe Quantenausbeute und hohe Absorptionsquerschnitte aus und eignen sich daher gut für diese ersten Zweifarben-Zweiphotonen-Anisotropiemessungen. Indol ist hinsichtlich seiner strukturellen Ähnlichkeit zu biorelevanten Molekülen wie Tryptophan interessant. Da diese Aminosäure Teil vieler Proteine ist, könnte eine genauere Charakterisierung der angeregten Zustände zu einem besseren Verständnis der Photophysik von Proteinen führen.

Die oben beschriebenen Polarisationsmessungen stellen nur einen Teil der vielfältigen Möglichkeiten der Multiphotonenspektroskopie dar. Ein weiterer Teil ist der Einsatz von Titan:Saphir Lasern bei biologischen Experimenten. Aufgrund der Anregung mit IR-Licht und der kurzen Pulse ist die Schädigung von biologischen Gewebe weniger ausgeprägt als bei herkömmlichen Fluoreszenzmethoden. In dieser Arbeit wurden mit einem Zweiphotonenmikroskop einige Aspekte des Metabolismus von  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) untersucht. Vor dem Hintergrund immer weiter ansteigender Diabetes mellitus-Erkrankungen [11] wird eine detaillierte Kenntnis des Stoffwechsels der Insulin ausschüttenden  $\beta$ -Zellen immer wichtiger.

Diabetes manifestiert sich in einem dauerhaft erhöhten Blutzuckerspiegel. Es treten verschiedene Formen von Diabetes auf. Während Diabetes vom Typ I hauptsächlich genetisch bedingt ist, liegt die Ursache für Diabetes vom Typ II überwiegend in Fehlernährung und der daraus resultierenden Adipositas [12]. Gerade in den letzten Jahren tritt diese Form vermehrt auch bei Jugendlichen auf, obwohl dieses früher erst im Alter der Fall war.

Zur Behandlung von Diabetes gibt es mehrere Ansätze, u.a. anderem die Gabe oraler Antidiabetika. Ziel aller Therapien ist die Senkung des Blutzuckerspiegels auf normale Werte. Einige erfolgsversprechende Medikamente wie z.B. Sulfonylharnstoffe sind im Einsatz [13], jedoch auch mit Nachteilen verbunden. So wirken sie auch bei nicht erhöhtem Blutzuckerspiegel und können so eine Hypoglykämie auslösen.

Für die Entwicklung neuer Ansätze zur Behandlung ist es daher nötig, den kompletten Mechanismus der Insulin-Sekretion zu verstehen. Dabei bedarf es nicht nur herkömmlicher Methoden wie den bekannten mikrofluorimetrischen, sondern es müssen auch alternative Methoden zum Einsatz kommen, um alle relevanten Einflussgrößen zu charakterisieren.

Die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas wird durch zwei intrazelluläre Signalwege gesteuert, die als „triggering pathway“ und „amplifying pathway“ bezeichnet werden [14]. Während der erste Weg relativ genau aufgeklärt ist, besteht bei letzterem genauerer Untersu-

chungsbedarf. Es wird vermutet, dass dort als Signalvermittler die Koenzyme NADH und NADPH eine Rolle spielen. Die Untersuchung des NADP(H)-Metabolismus von Pankreasinseln mit neuen Methoden war daher ein Hauptziel der Arbeit.

Im Rahmen der Arbeit wurden daher zeitaufgelöste und bildgebende Fluoreszenzmessungen (Fluoreszenzlebensdauer-Imaging, FLIM) verwendet. Sie sind in der Lage, über die Dynamik biologischer Systeme (Metabolismus) weitergehende Information als reine Fluoreszenzintensitätsmessungen zu liefern [15]. Nur mit FLIM kann z.B. das Verhältnis von Enzym gebundenem zu freiem NAD(P)H, während einer Stimulation von  $\beta$ -Zellen mit pharmakologischen Substanzen beobachtet werden. Dieses Verhältnis spiegelt einen Teil des NAD(P)H-Redoxmetabolismus wider und ist z.B. wichtig für die Reaktionsgeschwindigkeit mehrerer Enzyme, da diese von der freien NADH-Konzentration abhängt [16].

Für die schnelle Aufnahme und Auswertung der FLIM-Daten wurden entsprechende Methoden entwickelt. Die Fluoreszenz der meisten biologischen Proben zeigt ein multiexponentielles Abklingverhalten (z.B. das biexponentielle Verhalten von NADH- und NADPH). Für die Auswertung kam daher eine Reihe von verschiedenen Algorithmen zum Einsatz. In vorherigen Arbeiten [17] entwickelte neue Methoden wurden optimiert und ihre Genauigkeit bei der Auswertung von FLIM-Daten, die bei der Stimulation von  $\beta$ -Zellen mit verschiedenen Substanzen erhalten wurden, mit herkömmlichen Methoden verglichen.

Etablierte Methoden zur Untersuchung des Stoffwechsels von Pankreaszellen besitzen kaum räumliche Auflösung. Daher kam bei der Messung aller Daten ein Zweiphotonenmikroskop als neuartiges Untersuchungssystem zum Einsatz. Es bietet im Gegensatz zu den herkömmlichen Methoden eine intrinsische 3D-Auflösung, d.h. es ist potenziell möglich in Kombination mit FLIM einen kompletten Überblick über die Vorgänge in einer Zelle/Organ an jedem Punkt zu bekommen.

Neben NAD(P)H spielen Calciumionen eine entscheidende Rolle bei der Insulin-Sekretion [18]. Der Einstrom von Calciumionen (Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration) löst unter normalen physiologischen Bedingungen die Insulin-Ausschüttung aus. Zur in vitro Messung der Calciumkonzentration werden bestimmte Farbstoffe eingesetzt. Konventionelle Methoden basieren auf der Messung der Intensität der Fluoreszenz dieser Calciumindikatoren [19]. Da Intensitätsmessungen durch eine Reihe von Faktoren verfälscht werden können, FLIM-Messungen jedoch davon weitestgehend nicht betroffen sind [20], wurde eine Reihe



dieser Farbstoffe mit der FLIM-Methode zuerst in Lösung, dann in Zelllinien und in Pankreaszellen untersucht und mit reinen Intensitätsmessungen verglichen.

Die Arbeit ist folgendermaßen strukturiert: Im nachfolgenden Kapitel 2 werden die theoretischen Grundlagen zu Polarisation, Absorption, Fluoreszenz und Anisotropie, die für das Verständnis der Ergebnisse wichtig sind, dargelegt. Es wird zunächst ein kurzer Überblick über die Einsatzgebiete und Vorteile der Multiphotonenmikroskopie und die Historie von 2C2P-Messungen gegeben. Ausführlicher wird im Folgenden auf die Polarisationsabhängigkeit der durch Multiphotonenanregung induzierten Fluoreszenz, die dahinterliegende Theorie und den Bezug zum Experiment eingegangen. In Kapitel 3 werden die Rollen von NAD(P)H und Calcium in  $\beta$ -Zellen und der Zusammenhang zu Fluoreszenzlebensdauer-messungen näher erläutert. In Kapitel 4 werden die Mess- und Auswertemethoden für Fluoreszenzlebensdauer- und Polarisationsmessungen beschrieben und in Kapitel 5 die Ergebnisse der Messungen vorgestellt und diskutiert. Abschließend erfolgen eine Zusammenfassung und ein Ausblick.



## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Zum Verständnis der experimentellen Ergebnisse werden im Folgenden die Grundlagen für die Messungen erklärt, dabei werden die Gebiete nur soweit abgehandelt, wie sie zum Verständnis der Ergebnisse gebraucht werden; ansonsten sei auf Lehrwerke verwiesen.

### 2.1 Licht als elektromagnetische Strahlung

Die Ausbreitung von Licht kann man als räumliche und zeitliche Ausbreitung elektrischer und magnetischer Felder beschreiben, d.h. elektromagnetischer Wellen. Die mathematische Darstellung ist durch die Maxwell'schen Gleichungen gegeben. Üblicherweise konzentriert man sich dabei auf die elektrische Komponente des Lichts, da die Vektoren des elektrischen und magnetischen Feldes immer senkrecht zu einander stehen und die entsprechenden Ausdrücke leicht ineinander überführbar sind. Die Oszillationen des elektrischen Feldes bei seiner Ausbreitung im Raum können als transversale harmonische Welle beschrieben werden. Dabei ist die Ausrichtung/Oszillation des elektrischen Feldes immer senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Allgemein wird eine planare elektromagnetische Welle über komplexe Wellengleichungen beschrieben:

$$\vec{E}(\vec{x}, t) = \vec{E}_0 \cdot \exp[i(\omega t - \vec{k}\vec{x} + \varphi)] \quad (2.1)$$

$$\vec{E}(\vec{x}, t) = \vec{E}_0 \cdot [\cos(\omega t - \vec{k}\vec{x} + \varphi) + i \cdot \sin(\omega t - \vec{k}\vec{x} + \varphi)] \quad (2.2)$$

$\vec{E}(\vec{x}, t)$  ist die zeit- und ortsabhängige elektrische Feldstärke und  $\vec{E}_0$  ist die konstante Amplitude der elektrischen Feldstärke. Die Wellenzahl  $k$  als Betrag des Wellenvektors  $\vec{k}$  ist durch  $2\pi n/\lambda_{\text{nm}}$  definiert ( $\lambda_{\text{nm}}$  ist die Wellenlänge im Vakuum und  $n$  der Brechungsindex des Mediums in dem sich die Lichtwelle ausbreitet). Die Variable  $\omega$  ist die Kreisfrequenz ( $2\pi\nu$ ). Die

Phasenverschiebung wird mit  $\varphi$  bezeichnet. Entgegen der üblichen Konvention ist die Ausbreitung der Wellen in  $x$ -Richtung, um eine Kompatibilität zu den Achsen-Bezeichnungen der Koordinaten-Systeme bei Anisotropiemessungen zu schaffen.

### *Polarisation*

Bei der Beschreibung von Licht als elektromagnetische Welle gibt die Polarisation die Orientierung des elektrischen Feldvektors der Lichtwellen bei der Ausbreitung in Zeit und Raum an. Dieser E-Vektor steht bei transversalen Wellen immer senkrecht auf dem Ausbreitungsvektor. Man definiert unterschiedliche Arten von polarisiertem Licht: *Unpolarisiertes* oder teilweise polarisiertes Licht wird von vielen Lichtquellen wie der Sonne oder Glühlampen ausgesendet, der E-Vektor des Feldes hat dort keine bevorzugte Orientierung. Bei *linear* polarisiertem Licht hat der Feldvektor nur eine bevorzugte Richtung, während sich die Lichtwelle in  $x$ -Richtung ausbreitet. Bei der *zirkularen* Polarisation beschreibt der E-Vektor des elektrischen Feldes eine Kreisbahn. Man unterscheidet rechts und links zirkular polarisiertes Licht, je nachdem ob sich der E-Vektor mit oder gegen den Uhrzeigersinn dreht. Hierbei wird per Konvention in Ausbreitungsrichtung geblickt.

Beide Fälle können auch als Extremfälle von *elliptisch* polarisiertem Licht betrachtet werden; das bedeutet, dass sich prinzipiell alle Arten von polarisiertem Licht mathematisch in einander überführen lassen.

Eine sich in einem kartesischen Koordinatensystem in  $x$ -Richtung ausbreitende elektromagnetische Welle kann als Superposition zweier Wellen dargestellt werden, wobei die Komponenten in  $z$  und in  $y$ -Richtung polarisiert sind [21]:

$$\vec{E}_z(x, t) = \hat{i}E_{0z} \cdot \cos(kx - \omega t) \quad (2.3)$$

$$\vec{E}_y(x, t) = \hat{j}E_{0y} \cdot \cos(kx - \omega t + \varphi) \quad (2.4)$$

Die Vektoren  $\hat{i}$  und  $\hat{j}$  sind die Einheitsvektoren. Nimmt  $\varphi$  bei der Superposition von  $E_z$  und  $E_y$  nur ganzzahlige Vielfache von  $\pi$  an, so ist bei  $E_{0z} = E_{0y}$  die resultierende elektrische Welle eine linear polarisierte Welle, deren E-Vektor immer im  $45^\circ$ -Winkel zu den Achsen orientiert ist. Die Amplitude ist dagegen zeitlich nicht konstant.

Nimmt  $\varphi$  ganzzahlige Vielfache von  $\pm\pi/2$  an, so ergibt sich:

$$\vec{E}_z(x, t) = \hat{i}E_{0z} \cdot \cos(kx - \omega t) \quad (2.5)$$

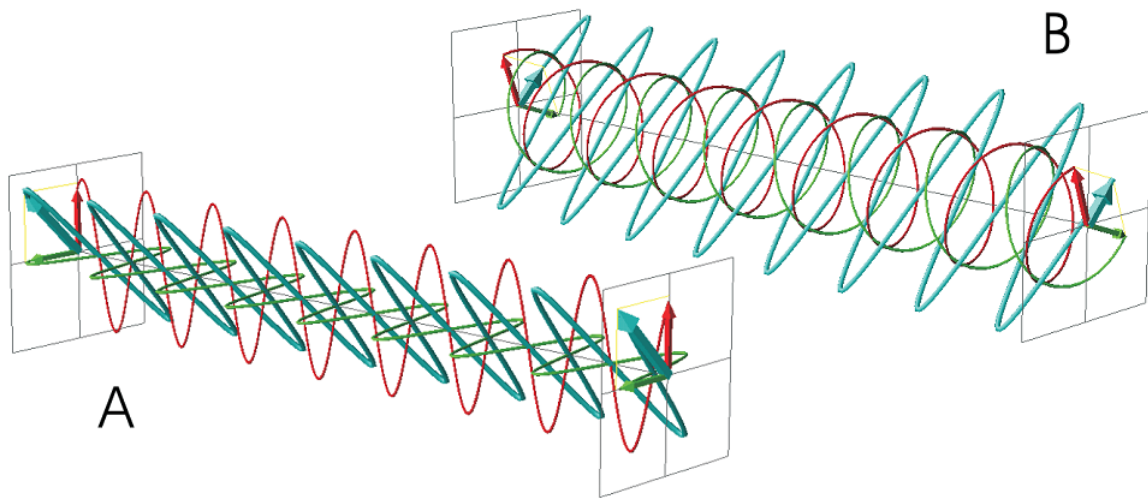
$$\vec{E}_y(x, t) = \hat{j} E_{0y} \cdot \sin(kx - \omega t) \quad (2.6)$$

$$\vec{E}(x, t) = E_0 [\hat{i} \cdot \cos(kx - \omega t) \pm \hat{j} \cdot \sin(kx - \omega t)] \quad (2.7)$$

Die Summe ist entweder eine links (-) oder rechts (+) zirkular polarisierte Welle, bei der die Richtung des E-Vektors zeitlich variiert, die Amplitude jedoch konstant bleibt.

Für alle anderen Werte der Phasendifferenz ergibt sich eine elliptisch polarisierte Welle, bei der zeitlich sowohl die Richtung als auch die Amplitude variiert.

In Abbildung 2-1 ist die Superposition verschiedener polarisierter Wellen dargestellt: Zwei linear polarisierte Wellen gleicher Amplitude, die keine Phasenverschiebung haben, ergeben eine andere linear polarisierte Welle, deren E-Vektor im 45°-Winkel zu den beide Komponenten steht. Die Überlagerung zweier entgegengesetzter polarisierten zirkularer Wellen gleicher Amplitude mit einer Phasendifferenz von  $\pi/2$  ergibt abermals eine im 45°-Winkel linear polarisierte Welle.



**Abbildung 2-1** A Superposition zweier linearer Polarisationen (rot senkrecht, grün horizontal, blau resultierende) einer Phasendifferenz von 0°; B Superposition zirkularer Polarisationen (rot links, grün rechts, blau resultierende) bei einer Phasendifferenz von 0°.

Die Betrachtungsweise von Licht als elektromagnetische Welle ist hilfreich beim Verständnis der Funktionsweise optischer Komponenten wie Verzögerungsplatten und Prismen und optischer Phänomene wie Dispersion oder Doppelbrechung etc.

### Jones Vektoren

Die Polarisierung von Licht, aber auch optische Komponenten, lassen sich mathematisch vereinfacht auch als normierte Einheits-Vektoren/Matrizen darstellen. Diese Darstellung macht alle weiteren Betrachtungen über Polarisation mathematisch überschaubarer:

**Tabelle 2-1 Polarisation in Jones-Vektoren-Schreibweise.**

Polarisation $\lambda$	Jones Vektor (x,y,z) Laborkoordinaten
Linear horizontal	(0,1,0)
Linear vertikal	(0,0,1)
Zirkular rechts	$1/\sqrt{2} (0,+i,1)$
Zirkular links	$1/\sqrt{2} (0,-i,1)$

Hierbei ist der Bezug zum Koordinatensystem wichtig: Die X-Achse repräsentiert hier die Ausbreitungsrichtung des Lichts, Y ist parallel zur Laborebene(tisch), und die Z-Achse steht senkrecht zur XY-Ebene. Für alle Polarisierungen  $\lambda$  gilt  $\lambda \cdot \lambda^* = 1$ .

### Dispersion

Bei der Behandlung von Licht als elektromagnetische Welle ergibt sich, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer Welle auch vom Brechungsindex des Mediums abhängt. Er ist eine frequenzabhängige Größe und steigt im Falle der normalen Dispersion im sichtbaren Bereich des Lichts mit der Frequenz an. Dies spielt insbesondere bei Femtosekundenpulsen eine große Rolle, da diese eine große spektrale Breite haben. Durchlaufen sie Medien wie Glas, kommt es zu einer zeitlichen Verbreiterung der Pulse, was bei der Zweiphotonenmikroskopie berücksichtigt werden muss.

Bei intensivem Laserlicht (hohe Feldstärken) können zusätzlich auch noch andere Effekte auftreten: Vom elektrischen Feld (Feldstärke  $E$ ) wird eine Polarisierung  $P$  im Medium induziert (nicht zu verwechseln mit der Polarisation des Lichts). Den Zusammenhang von  $E$  und  $P$  kann mit:

$$P = \epsilon_0 (X_1 E + X_2 E^2 + X_3 E^3 + \dots) \quad (2.8)$$

beschrieben werden [22]. Die elektrische Suszeptibilitäten  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  sind Größen, die vom Medium und von der Frequenz des Lichts abhängen. Die Variable  $\epsilon_0$  ist die elektrische Feldkonstante. Bei niedrigen Feldstärken ist die Polarisierung nur eine lineare Funktion der Feld-

stärke, da  $X_2$  und  $X_3$  vernachlässigbar klein sind. Bei hohen Feldstärken und bei bestimmten Medien müssen die nichtlinearen Terme zu berücksichtigen, mit welchen man Phänomene wie Frequenzverdopplung (SHG,  $X_2$  wird groß in bestimmten Kristallen) oder Multiphotonenanregung und die Funktionsweise eines Ti:Saphir Lasers (Kerr-Effekt und Selbstphasenmodulation ( $X_3$ -Term wird relevant) mathematisch erklären kann [22,23].

## 2.2 Absorption und Fluoreszenz

Bei der Wechselwirkung von Licht mit Molekülen können diese in einen angeregten elektronischen Zustand versetzt werden. Die relevanten Größen, die diese Wechselwirkung und den Weg zurück in den Grundzustand beschreiben, sollen im Folgenden mit Blick auf die Fluoreszenzlebensdauerspektroskopie beschrieben werden.

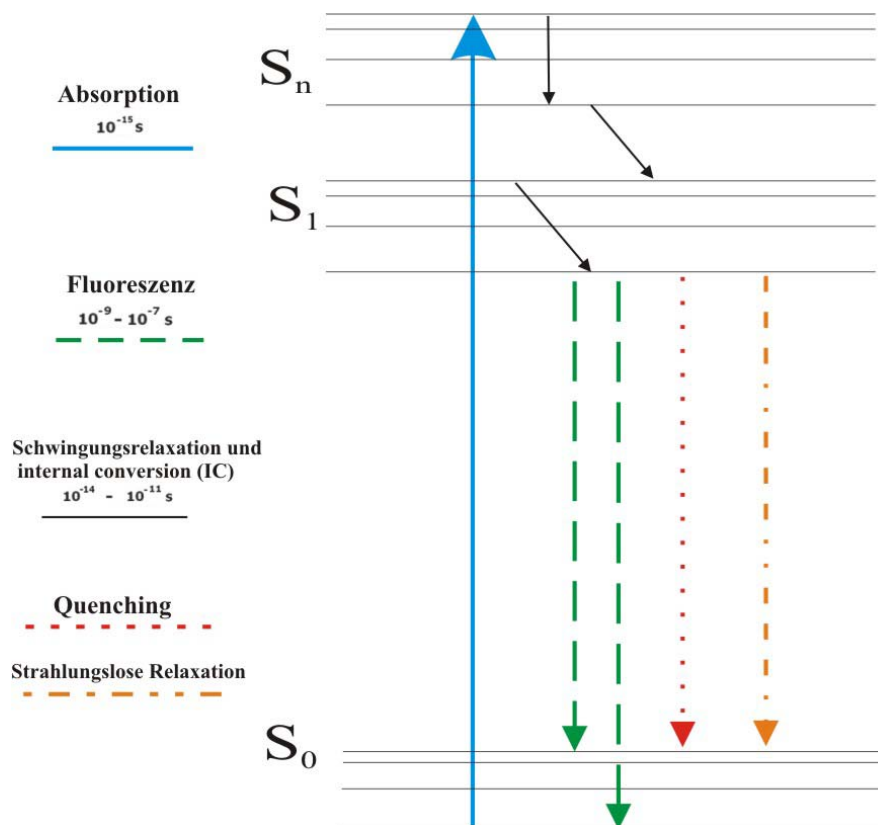


Abbildung 2-2 Vereinfachtes Jablonski-Diagramm, Übergänge in Triplettzustände wurden hier ausgelassen.

### Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute

Wird ein Molekül durch Absorption eines Photons in einen angeregten Zustand ( $S_1/S_n$ ) versetzt, so kann die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand  $S_0$  auf verschiedenen Wegen erfolgen. Eine Auswahl dieser Möglichkeiten ist in Abbildung 2-2 dargestellt. Übergänge in Triplett-Zustände wurden hierbei ausgelassen.

Als Fluoreszenz wird die Emission eines Photons beim Übergang vom  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$  bezeichnet. Die Quantenausbeute beschreibt das Verhältnis der Anzahl von emittierten Fluoreszenzphotonen zu absorbierten Photonen. Die Größe der Quantenausbeute liegt zwischen Null und Eins, und lässt sich über durch die Raten der oben aufgeführten Prozesse beschreiben:

$$Q = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{nr} + k_q} \quad (2.9)$$

Die Strahlungsrate  $k_{rad}$  ist der Kehrwert der natürlichen Lebensdauer des angeregten Zustands,  $k_q$  die Rate des Quenchings der Fluoreszenz, was z.B. durch andere Moleküle wie Sauerstoff geschieht, und  $k_{nr}$  ist die Rate, die strahlungslose Prozesse beschreibt. Ist die Strahlungsrate groß im Verhältnis zu den anderen Prozessen, nähert sich  $Q$  eins an.

Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_f$  ist eine intrinsische Eigenschaft eines jeden Moleküls und ist direkt mit der Quantenausbeute verknüpft:

$$\tau_f = Q/k_{rad} \quad (2.10)$$

Sie ist ein Maß dafür, wie lange ein Molekül nach Anregung im angeregten Zustand bleibt. Die Lebensdauer des angeregten Zustands eines Fluorophors hängt entscheidend davon ab, ob strahlungslose Prozesse ablaufen. In welchem Maße diese Prozesse ablaufen, hängt von der Mikroumgebung ab. Bei vielen Fluorophoren ist der im Lösungsmittel gelöste Sauerstoff ein starker Faktor [24,25]. Beeinflussende Faktoren können z.B. auch die Ionenstärke, der Brechungsindex und die lokale Viskosität in einer Lösung sein. Auch durch generelle Konformationsänderungen kann es zu Lebensdaueränderungen kommen. Man kann also durch Messen der Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors (in dieser Arbeit auch FLIM, Fluorescence Lifetime Imaging genannt) Rückschlüsse auf die Umgebung ziehen. Je nachdem, welche Parameter man bei einer Messung beobachten will, wählt man unterschiedliche Farbstoffe: Die Lebensdauer von „BCECF“ wird beispielsweise stark vom pH-Wert [26], die von „Fura-2“ von der Calciumkonzentration [27] und die des Farbstoffs „DASPI“ von der Viskosität beeinflusst [28]. Fluoreszenzlebensdauer-Messungen lassen sich daher auf biologische Bereiche anwenden, bei denen viele zelluläre Parameter beobachtet werden können.

Bei Anregung eines Ensembles von Molekülen mit einem kurzen Puls ist die Zahl der Moleküle  $N$  im angeregten Zustand zum Zeitpunkt  $t$  durch



$$N(t) = N(0) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) \quad (2.11)$$

definiert. Die Emission eines Fluoreszenzphotons ist ein zufälliger Prozess. Die meisten Photonen werden direkt nach der Puls emittiert, ein kleinerer Teil erst längere Zeit nach dem Puls. Die Intensität der Fluoreszenz  $F(t)$  ist proportional zu  $N(t)$ . Gegen die Zeit aufgetragen, ergibt sich daher eine exponentielle Funktion, die „Fluoreszenzabklingkurve“. Diese kann mit verschiedenen experimentellen Methoden gemessen werden und die Fluoreszenzlebensdauer kann durch Anpassen einer Funktion ermittelt werden. Befinden sich mehrere Fluorophore in Lösung wird die Fluoreszenzintensität meist durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschrieben (s. auch Abschnitt 4.7).

Der Vorteil von Fluoreszenzlebensdauer-Messungen gegenüber Intensitätsmessungen ist die Unabhängigkeit sowohl von der Anregungsintensität des Lasers, von der Photobleichung als auch von der Konzentration des Fluorophors, solange man sich im mikromolaren Konzentrationsbereich bewegt. Liegt die Konzentration der Fluorophore deutlich über diesem Bereich, kann es zu einer Verlängerung der Lebensdauer durch Selbstabsorption (Strahlungstransfer) oder auch zur einer Bildung nicht fluoreszierender Komplexe kommen (Self-Quenching).

### *Auswahlregeln*

Die Wahrscheinlichkeit für die Absorption eines Photons kann man mit dem Übergangsdipolmoment  $\vec{\vartheta}^{fi}$  ausdrücken. Die Funktion, mit der das Übergangsdipolmoment berechnet wird, verknüpft die Wellenfunktion  $\Psi$  des Grundzustands  $i$  (initial state) mit der des angeregten Zustands  $f$  (final state).  $\mathbf{r}_a$  ist der elektrische Dipolmoment-Operator in Richtung  $a$  (molekularen Koordinaten). Dabei ist die Gesamtwellenfunktion eines Zustands das Produkt von elektronischer, vibronischer und Rotationswellenfunktion. Das Dipolmoment kann als dreidimensionaler Vektor dargestellt werden, dessen Elemente mit

$$\vec{\vartheta}_a^{fi} = \langle \Psi_f | \mathbf{r}_a | \Psi_i \rangle \quad (2.12)$$

berechnet werden können.

Damit ein Übergang erlaubt ist, muss das Übergangsdipolmoment  $\vec{\vartheta}^{fi}$  größer als Null sein. Die Verknüpfung zur experimentellen Beobachtung ergibt sich aus dem Quadrat des Übergangsdipolmoments:

$$\sigma \propto |\lambda \cdot \vec{g}^{fi}|^2 \quad (2.13)$$

Betrachtet man nun die Wechselwirkung eines Photons der Polarisation  $\lambda$  mit einem Molekül, so ist der Absorptionsquerschnitt  $\sigma$  bei einer bestimmten Wellenlänge proportional zum Quadrat der Projektion der Polarisation des Photons auf das Dipolmoment (Skalarprodukt). Die Größe des Dipolmomentes hängt von der Symmetrie der elektronischen Wellenfunktionen und zusätzlich vom Überlapp der Schwingungswellenfunktionen ab. Letzterer wird durch die Franck-Condon-Faktoren beschrieben, auf die hier nicht eingegangen werden soll.

Basierend auf den Strukturen und Symmetrien der Moleküle lassen sich Regeln ableiten, zwischen welchen Wellenfunktionen prinzipiell elektronische Übergänge erlaubt sind, d.h. wann das Dipolmoment nicht Null ist. Den Wellenfunktionen eines Moleküls können nach der Gruppentheorie irreduzible Darstellungen zugeordnet werden. Die Wellenfunktion des Grundzustands eines Moleküls ändert meistens bei keiner Symmetrioperation (Spiegelung, Drehung etc.) ihr Vorzeichen; ihr kann deshalb die totalsymmetrische Darstellung ( $A_g$ ,  $A_1$  etc.) der entsprechenden Punktgruppe zugeordnet werden.

Damit ein Übergang stattfinden kann, muss das Produkt der Symmetrien von Wellenfunktion des Grundzustandes, des elektrischen Dipolmomentoperators und der Symmetrie des angeregten Zustands die totalsymmetrische Darstellung der Punktgruppe enthalten. Für zentrosymmetrische Moleküle mit Inversionszentrum leitet sich daraus die bekannte Laporte-Regel für Einphotonenübergänge ab: Ein Übergang ist nur von geraden Zuständen (g) auf ungerade (u)-Zustände erlaubt (und umgekehrt). Eine weitere Regel ist die Pseudo-Paritätsregel, die vor allem Molekülen mit konjugierten Doppelbindungen eine Anwendung findet und für Spiegelungen an einer Molekülebene gilt [1]: Für Einphotonenanregung (OPE) sind nur Übergänge von (-) nach (-) erlaubt. Die Symmetrie bzw. Polarisation des anregenden Photons muss mit der des Dipolmomentoperators übereinstimmen, damit eine Wechselwirkung stattfinden kann.

In Tabelle 2-2 ist exemplarisch die Charaktertafel für die Punktgruppe  $C_{2h}$  aufgeführt, da diese später mehrmals verwendet wird. In der ersten Spalte sind die Rassen der irreduziblen Darstellungen aufgeführt, in der ersten Zeile die Symmetrioperationen, die beiden letzten Spalten führen die Funktionen bzw. Orbitale auf, die wie eine irreduzible Darstellung transformieren. Die Funktionen erlauben einen Überblick über die Lage des Dipolmoments im Molekül (x,y,z) und ob ein Übergang für OPE (x,y,z) oder TPE (Zweiphotonenanregung) erlaubt ist

(xz, xx,yy,xy, etc.): Für OPE ist demnach ein Übergang nach  $A_u$  und  $B_u$ , für TPE ein Übergang nach  $A_g$  und  $B_g$  erlaubt.

Tabelle 2-2 Charaktertafel für die die Punktgruppe  $C_{2h}$ .

$C_{2h}$	E	C2	$\sigma_h$	i		
$A_g$	1	1	1	1	$R_z$	xx,yy,zz, xy
$B_g$	1	-1	-1	1	$R_y, R_y$	yz, xz
$A_u$	1	1	-1	-1	z	
$B_u$	1	-1	1	-1	x,y	

Diese Auswahlregeln gelten natürlich nur im Idealfall, bei Erhalt der Symmetrie. Durch Molekülschwingen (Biegeschwingungen, Streckschwingungen) wird die Symmetrie des Moleküls erniedrigt, so dass eigentlich verbotene Übergänge schwach erlaubt werden und z.B. im UV-Spektrum als Banden niedriger Intensität auftauchen. Dies spielt eine besonders große Rolle bei der Zweiphotonenspektroskopie von z.B. Benzol. Dort ist der niedrigste elektronische Zustand eigentlich symmetrieverboten ( $B_{2u}$ ). Durch Kopplungen mit ungeraden Schwingungsmoden ( $b_{1u}$ ,  $e_{1u}$ , etc.) entstehen Zustände gerader Symmetrie, die dann als Banden im Spektrum auftauchen [29].

Die Abhängigkeit des Querschnitts von der Polarisation des Photons gilt nur bei ausgerichteten Molekülen (Kristallen) und wird bei Anregung von zufällig orientierten Molekülen in Lösung oder Gasphase aufgehoben. Der dort gemessene mittlere Querschnitt  $\langle\sigma\rangle$  wird über alle Orientierungen des Dipolmomentes gebildet und ist nach McClain [3]:

$$\langle\sigma\rangle \propto 1/3 (\lambda \cdot \lambda^*) \left( \vec{\vartheta}^{fi} \cdot \vec{\vartheta}^{fi*} \right) \quad (2.14)$$

Da  $(\lambda \cdot \lambda^*)$  immer gleich 1 ist, ist die Einphotonenabsorption unabhängig von der Polarisation.

### 2.3 Multiphotonenmikroskopie

Die Zweiphotonenanregung (TPE) wurde schon in den 30er Jahren theoretisch von Göppert-Mayer im Rahmen von Störungsrechnungen zweiter Ordnung vorhergesagt [30], die mehrere Jahre zuvor von Dirac entwickelt worden war. Erst in den 60er Jahren wurde die Zweiphotonenanregung mit den ersten Rubin-Lasern nachgewiesen, da man nur mit Lasern ausreichend hohe Anregungsintensitäten erreichen konnte, die zur Beobachtung des Effekts notwendig sind. In der Folgezeit wurden Zweiphotonenmessungen hauptsächlich zur Untersuchungen von spektroskopischen Übergängen von Molekülen in Lösungen/Gasphase eingesetzt. In Abbildung 2-3 wird das Prinzip veranschaulicht: Zwei Photonen mit identischer oder auch unterschiedlicher Energie müssen mit einem Molekül innerhalb von  $10^{-16}$  s wechselwirken, damit Zweiphotonenanregung überhaupt stattfinden kann. In einer anschaulichen Beschreibung regt das erste Photon auf ein virtuelles Niveau an, durch das zweite Photon erfolgt der Übergang in einen elektronisch angeregten Zustand, meist in dessen höher angeregte Schwingungsniveaus. Relaxation in den Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustandes erfolgt innerhalb weniger Pikosekunden.

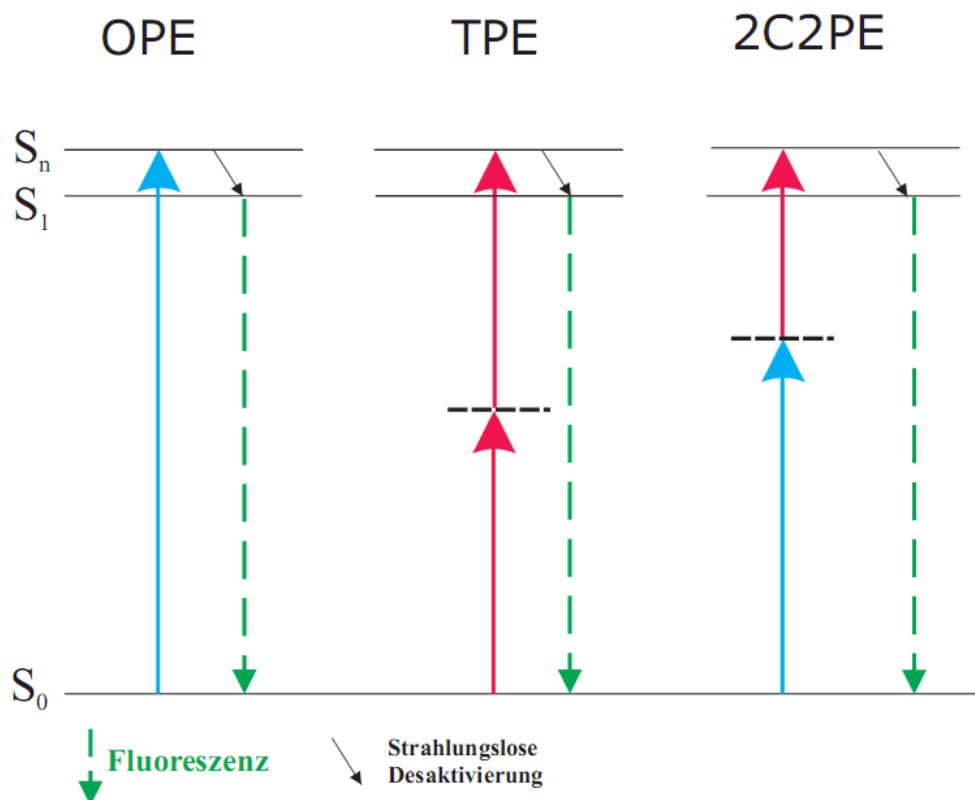


Abbildung 2-3 Schematische Darstellung: Ein-, Zweiphotonenanregung und Mehrfarbenanregung in einem vereinfachten Jablonski-Diagramm.

Durch eine Multiphotonenanregung kann man also mit Licht der doppelten Wellenlänge (im Vergleich zu OPE) in energetisch gleiche elektronische Zustände anregen. Ähnliche Anre-

gungsraten wie bei OPE werden jedoch bei TPE erst bei hohen Photonenflussdichten erreicht. Die aufgrund der Auswahlregeln und Symmetriegründen theoretisch unterschiedlichen OPE und TPE-Absorptionsspektren ähneln sich in der Praxis; das Zweiphotonenabsorptionsmaximum vieler Fluorophore ist nur geringfügig gegenüber dem Einphotonenmaximum ins Blaue verschoben. Dies ist auf die Überlagerung von Zuständen und auf schwingungsinduzierte Übergänge zurückzuführen. Aus diesem Grund lassen sich fast alle Fluorophore, die im sichtbaren Bereich absorbieren, auch für Zweiphotonenmessungen nutzen. Eine Ausnahme bilden die Xanthen-Fluorophore, zu denen alle Rhodamin-Farbstoffe gehören. [31]. Ein breit angelegter Vergleich zwischen den OPE und TPE-Spektren ist bei Makarov *et al.* zu finden [32].

Bei Einphotonen-Messungen ist als Maß für die Absorptionswahrscheinlichkeit von Molekülen der molare Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  definiert, der aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz bekannt ist. Die analoge molekulare Größe ist der Absorptionsquerschnitt  $\sigma$ , der in Einheiten von  $\text{cm}^2$  angegeben wird. Übliche Fluoreszenzfarbstoffe haben Querschnitte in der Größenordnung von  $10^{-16} \text{ cm}^2$  bis  $10^{-18} \text{ cm}^2$ . Bei Zweiphotonenabsorptionsspektren wird der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt (two-photon absorption cross section)  $\delta$  in  $(\text{cm}^4 \cdot \text{s})/\text{Photon}$  oder das Produkt von Quantenausbeute  $Q$  und Querschnitt  $\delta$  (TPE action cross section) angegeben. Oft wird  $\delta$  auch in der Einheit GM (Göppert-Mayer) angeführt. Ein GM entspricht  $1 \cdot 10^{-50} (\text{cm}^4 \cdot \text{s})/\text{Photon}$ . Fluoreszenzfarbstoffe haben 10-100 GM, Autofluorophore in Zellen wie NADH oder FAD haben bis zu tausendmal geringere Querschnitte [31,33]. Einfache Vergleiche zwischen Ein- und Zweiphotonenabsorptionsraten lassen sich über

$$k_{OPE} = \sigma \cdot \Phi \quad (2.15)$$

und

$$k_{TPE} = \delta \cdot \Phi^2 \quad (2.16)$$

führen, wobei die Anregungsrate  $k_{TPE}$  quadratisch von der Photonenflussdichte  $\Phi$  (Photonen pro Fläche und Zeit) abhängig ist, da das Molekül mit zwei Photonen wechselwirkt. Hohe Photonenflussdichten sind nötig, um Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie in biologischen Proben zu betreiben. Dies ist nur durch die Fokussierung von kurz gepulstem Laserlicht zu erreichen. Um die Unterschiede zwischen OPE und TPE zu verdeutlichen hier eine Beispielrechnung: 10 mW cw-Licht (800 nm) entsprechen ca.  $4 \cdot 10^{16}$  Photonen pro Sekunde. Wird dieses Licht mit einem Mikroskopobjektiv fokussiert (Fläche der Fokusebene ca.  $1 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2$ ), ergibt sich eine Photonenflussdichte  $\Phi$  von ca.  $4 \cdot 10^{25} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Aufgrund der verschiedenen Querschnitte ist  $k_{OPE}$  hier bis zu  $1 \cdot 10^8$  größer als  $k_{TPE}$ , daher wird Einphotonen-Mikroskopie

auch unfokussiert (Widefield-Mikroskopie) mit Quecksilber-Lampen oder LEDs niedriger Leistung betrieben. Durch kurze Femtosekundenpulse wird  $\Phi$  ca.  $1 \cdot 10^5$ -fach größer, so dass genug Fluoreszenzphotonen pro Sekunde für bildgebende Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie emittiert werden [34].

Die gemessene Fluoreszenzintensität in einem Zweiphotonenmikroskop ist von mehreren Faktoren abhängig (Xu *et al.* in [35]). Zum einen natürlich von den Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes wie Konzentration, Quantenausbeute und Absorptionsquerschnitt zum anderen von technischen Faktoren wie Kürze der Anregungspulse, der Menge an eingestrahnten Photonen in der Probe und der Detektionseffizienz der Fluoreszenz. Die technischen Faktoren bestimmen die Größe der Photonenflussdichte in der Probe.

Bis in die 90er Jahre fanden Zweiphotonenanregungen in der Biologie aufgrund nicht verfügbarer passender Laser kaum eine Anwendung. Seit der praktischen Anwendung von Zweiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie vor ca. 20 Jahren von Denk und Strickler [2] sind die Beispiele für Zweiphotonenmessungen mit biologischer Anwendung stark angestiegen. Heutzutage werden Zweiphotonenmikroskope meistens bei Messungen tief im Gewebe wie z.B. zur Visualisierung von Calcium-Strömen tief im Gehirn von Mäusen eingesetzt [36,37]. Als Beispiele für die zahlreichen Abhandlungen über Zweiphotonenmikroskopie in der Biologie seien hier zwei Reviews von Zipfel *et al.* genannt [34,38]. Ein weiteres Einsatzgebiet für Zweiphotonenmikroskopie ist Haut(gewebe) [39].

#### *Titan:Saphir-Laser*

Zur Realisierung von Zweiphotonenmessungen werden heute meistens Titan:Saphir Laser eingesetzt. Sie haben mehrere herausragende Eigenschaften, die sie für zeit- und polarisationsaufgelöste Messungen exzellent geeignet machen: Die Wellenlängen sind über einen breiten Bereich verstellbar (690 nm – 1030 nm), so dass fast alle Fluorophore, die im sichtbaren Bereich (400 nm – 650 nm) fluoreszieren angeregt werden können. Gleichzeitig ist eine hohe mittlere Leistung ( $> 2.5$  W mittlere Leistung) bei kleiner Pulsenergie und hohen Wiederholraten (80 MHz) verfügbar, so dass auch Zweiphotonenmessungen in biologische Proben ohne Schädigung durchgeführt werden können. Kurze Pulse sind entscheidend für die Zweiphotonenmikroskopie, da die Intensität reziprok von der Pulsbreite abhängt [32]. Auf die technologischen Prinzipien zur Generierung kurzer Pulse soll hier nicht eingegangen werden. Eine gute Übersicht über Methoden zur Erzeugung ultrakurzer Lichtpulse in Titan:Saphir Lasern ist beispielweise bei Kasper zu finden [23].

Zweiphotonenmikroskopie hat eine Reihe von Vorteilen, die sie gut geeignet für Zellmikroskopie machen:

**Intrinsische 3D-Auflösung:** Bei der TPE ist die Anregungswahrscheinlichkeit quadratisch von der Photonenflussdichte abhängig. Bei OPE sieht man nicht nur die im Fokus fluoreszierenden Moleküle, die Anregungsrate ist auch außerhalb des Fokalbereiches groß genug. Bei TPE hingegen, sieht man nur die Moleküle im Fokus fluoreszieren, außerhalb ist die Anregungsrate so gering, dass keine signifikante Fluoreszenz feststellbar ist. In Abbildung 2-4 ist zu sehen, was dies experimentell zu bedeuten hat. Durch die enge Begrenzung des Fokalbereiches ist es möglich eine Zelle oder ein Objekt durch Bewegung der Probe oder des Laserfokus „abzurastern“ und so durch entsprechende Abbildungsoptik und Datenverarbeitung ein scharfes 3D-Bild der Fluoreszenz zu bekommen.

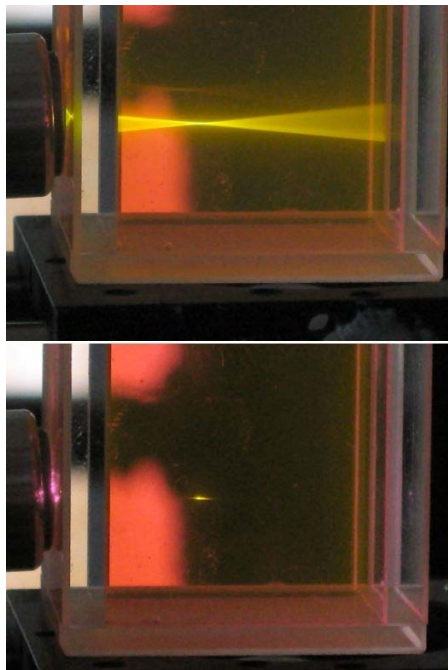


Abbildung 2-4 Vergleich zwischen OPE und TPE: Einphotonenanregung (oben) und Zweiphotonenanregung (unten), Anregung von Rhodamin 6G in Ethanol mit 400 und 800 nm.

**Geringe Photobleichung:** Bedingt durch die lokalisierte Anregung kann im Vergleich zur OPE nur im fokalen Teil der Probe Photobleichung/Schädigung bei biologischen Proben auftreten. Durch zu kurze Pulse können jedoch auch andere Arten der Schädigung in Zellen auftreten.

**Bessere Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht:** Da bei der TPE das Emissionslicht ( $\lambda \geq 450$  nm) und das Anregungslicht ( $\lambda \geq 700$  nm) einen deutlich unterschiedlichen Wellenlängenbereich haben, kann man sie durch spektrale Filter vollkommen voneinander abtrennen.

**Höhere Eindringtiefe mit IR:** Da biologische Proben nur wenig im IR-Bereich absorbieren, kann eine höhere Eindringtiefe in Gewebeproben erreicht werden und damit auch eine verbesserte Tiefenauflösung. Weniger Absorption bedeutet auch gleichzeitig weniger potentielle Schädigung.

**Weniger Streulicht:** Durch die Anregung im roten/IR-Bereich wird die Rayleigh-Streuung in der Probe auf 1/16 reduziert.

**Nachteile** der Zweiphotonenanregung sind das deutlich niedrigere Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Einphotonenspektroskopie und die Kosten für ein Zweiphotonen-Laser-System. Für einfache mikroskopische Aufnahmen von angefärbten Zellen ohne Zeitauflösung oder 3D-Auflösung reicht das Licht von Xenonlampen in Kombination mit verschiedenen Farbfiltren daher völlig aus.

### 2.3.1 Zweifarben-Zweiphotonen-Mikroskopie (2C2P)

2C2P ist der allgemeine Fall der Multiphotonenanregung. Während die Beispiele für Zweiphotonenmessungen mit einer Farbe mittlerweile sehr zahlreich sind, gibt es bislang nur wenige Beispiele für Zweifarben-Zweiphotonen-Fluoreszenzmessungen. Dies hat vor allem technische Gründe. Für 2C2P müssen zwei Photonen unterschiedlicher Wellenlängen generiert und sowohl räumlich und zeitlich synchronisiert werden. Zum anderen können viele experimentelle Fragestellungen, die z.B. die Fluoreszenz im sichtbaren Bereich betreffen, auch durch die Anregung mit zwei Photonen der gleichen Wellenlänge beantwortet werden. Unter diesen Themenbereich fällt z.B. auch die Zweiphotonenspektroskopie von NAD(P)H oder FLIM von Calciumkonzentrationen. Eine aufwändige Synchronisation fällt bei zwei identischen Photonen aus einer Laserquelle naturgemäß weg.

Die Anwendungsgebiete, bei denen die Vorteile von 2C2P gegenüber der 1C2P-Anregung zur Geltung kommen, lassen sich in drei Gruppen einteilen. Hier soll zunächst auf die Literatur verwiesen werden: 1) Spektroskopische Untersuchungen von Zweiphotonenübergängen und deren Symmetrie; 2) Auflösungsverbesserung in stark streuenden Proben durch Einsatz von Zweifarben; 3) Anregung mit gepulsten Lasern, Anregung von UV-Fluorophoren mit Fokus auf biologische Anwendung.



*Zu 1)*

Ziel aller spektroskopischen Untersuchungen ist die Bestimmung der Symmetrie der angeregten Zustände und der Abgleich mit theoretischen Berechnungen über die Lage und Größe der involvierten Dipolmomente. Dieses lässt sich durch Absorptionsmessungen und Anisotropiemessungen mit polarisiertem Laserlicht erreichen. Eine der ersten 2C2P-Messungen wurde von Fröhlich und Mahr zu Beginn der 60er Jahre an Anthracene-Kristallen durchgeführt [40]. Bei Kristallmessungen lassen sich die Symmetrie des angeregten Zustands und die involvierten Dipolmomente gut bestimmen, da die Anordnung der Moleküle im Kristall bekannt ist. Die Züchtung dieser Kristalle stellt allerdings oft ein unüberwindliches experimentelles Hindernis dar.

Zu Beginn der 70er wurden von Monson und McClain in einer Reihe von Artikeln die theoretischen und praktischen Grundlagen für spektroskopische Absorptionsmessungen mit zwei Photonen von Molekülen in Lösungen gelegt, später erweiterten sie die Theorie allgemein auf Dreiphotonen-Phänomene wie z.B. durch Zweiphotonenanregung induzierte Fluoreszenz [4,41–43]. Sie legten detailliert dar, welche Informationen (z.B. Symmetrie, Lage und Größe der Dipolmomente) man über ein Molekül bei solchen Messungen erhalten kann. Zweifarben-Zweiphotonenmessungen sind teilweise aus Messungen an Kristallen bekannt [44]. Einige wenige unvollständige Messungen wurden in flüssiger oder gasförmiger Phase an aromatischen Molekülen durchgeführt. Als Anregungsquellen wurden dabei Rubinlaser und Blitzlichtlampen oder zwei synchronisierte Farbstofflaser eingesetzt [5,45].

*Zu 2)*

Die 2C2P-Methode von Saloma basiert auf der Generierung von zwei unterschiedlichen Wellenlängen durch einen Raman-Shifter [46–48]. Sie und andere zeigten in der Theorie und Praxis, dass man durch den Einsatz von zwei Wellenlängen eine Auflösungsverbesserung besonders in stark streuenden Proben erreichen kann [49–53].

*Zu 3)*

In den 90er Jahre griffen Lakowicz und Gryczynski das Konzept von 2C2P wieder auf und präsentierten für eine Reihe von Molekülen erstmals 2C2P-Messungen mit kurzgepulsten Lasern [9,54,55]. Die zweite Wellenlänge wurde dabei durch Frequenzverdopplung. Auf die Polarisationsabhängigkeit von 2C2P gingen sie nur teilweise ein; sie zeigten wie die Absorp-

tion bzw. Fluoreszenzintensität vom Winkel zwischen zwei linear polarisierten Photonen abhängt, zirkulare Polarisierung wurde jedoch nicht berücksichtigt.

Quentmeier und Denicke zeigten, dass die Messungen von Lakowicz mit ähnlichem experimentellen Aufbau auch mit Femtosekundenpulsen durchführbar sind und demonstrierten eine Reihe von Anwendungen für 2C2P: Die Verdauung eines Proteins durch Subtilisin/Elastase konnte anhand der sich ändernden Lebensdauer von intrinsisch angeregter Fluoreszenz gemessen werden, woraus sich mögliche Anwendungen im Bereich des High-Throughput-Screenings von Proteinen ergeben. Weiterhin konnte erstmalig die prinzipielle Machbarkeit von 2C2P-Mikroskopie mit herkömmlichen Mikroskopen anhand der Protein-Fluoreszenz von Zellen demonstriert werden [10,56–58].

In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt des Einsatzes von 2C2P auf der spektroskopischen Untersuchung von Zweiphotonenübergängen.

#### *Praxis von 2C2P*

Das gemessene Fluoreszenzsignal  $F$  einer Zweifarben-Zweiphotonenanregung setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen:

$$F = F(OPE) + F(TPE) + F(TrTPE) + F(2C2P) \quad (2.17)$$

Damit 2C2P-Absorptionseffekte überhaupt gemessen werden können, sollte der Beitrag der drei Konkurrenz-Prozesse möglichst klein sein. Bei den im Experiment verwendeten Farbstoffen (UV-Fluorophore mit Absorptionsmaxima im Bereich 250-280 nm) und Wellenlängen (400 nm und 800 nm), kann der Beitrag der Einphotonenfluoreszenz völlig vernachlässigt werden, da dort die Absorptionsquerschnitte zu klein sind. Bei UV-Fluorophoren ist der Beitrag von  $F(TPE)$  vergleichsweise größer, da durch das frequenzverdoppelte Licht (400 nm) auch eine Zweiphotonenanregung in höher angeregte elektronische Zustände der Fluorophore stattfinden kann. Eine Dreiphotonenanregung ( $TrPE$ ,  $3 \times 800$  nm) ist aufgrund der kleinen Absorptionsquerschnitte (ca.  $1 \cdot 10^{-83} \text{ cm}^6 \cdot \text{s}^2$ ) auch bei hoher Einstrahlleistung unwahrscheinlich.

Die 2C2P-Intensität hängt vom Produkt der beiden Photonenflussdichten der eingestrahnten Photonen ab:

$$k_{2C2P} = \delta \cdot \Phi_{400} \cdot \Phi_{800} \quad (2.18)$$

Die Abhängigkeit des 2C2P-Signal von  $\Phi_{400}$  und  $\Phi_{800}$  ist von großem Vorteil. Die Leistung des 400 nm Strahls wird im Experiment niedrig gehalten (ca. 4 mW) und die Leistung des 800 nm Strahls umso höher (ca. 100 mW), so dass das Background-Signal lediglich 3 % des reinen 2C2P-Signal ausmacht. Durch die Kombination anderer Wellenlängen können auch deutlich höhere Verhältnisse erreicht werden [54].

Neben der Anregung von UV-Fluorophoren ermöglicht die Verwendung der zweier Pulse auch eine Kreuzkorrelation der Pulse zur Bestimmung der Pulsbreite und damit einer Optimierungsmöglichkeit für die Signalstärke. Gerade bei der Zweiphotonen-Mikroskopie mit Femtosekundenpulsen (große spektrale Breite) und Objektiven hoher numerischer Apertur machen sich Effekte wie chromatische Dispersion deutlich bemerkbar [56] und die Kreuzkorrelation zweier Farben bietet eine genaue und schnelle Möglichkeit die Stärke dieser Effekte zu vermessen, ohne auf die Verwendung eines Autokorrelators angewiesen zu sein.

## 2.4 Anisotropie

Man kann die Polarisations-Eigenschaften von Licht nicht nur bei Konzentrationsbestimmung von chiralen Molekülen (Polarimetrie) oder für die Zuordnung der Struktur von Proteinen (zirkulare Dichroismusmessungen) benutzen [59], sondern auch für die Bestimmung der Ausrichtung von Molekülen und für deren Rotationseigenschaften. Eine Methode ist das Messen der Fluoreszenzanisotropie. Eine detaillierte Darstellung für die Theorie und Applikationen von Anisotropiemessungen ist bei Lakowicz zu finden [60]. Die Anisotropie  $r$  ist als das Verhältnis der Differenz vom parallelen Fluoreszenzkanal  $I_{\parallel}$  und senkrechten Fluoreszenzkanal  $I_{\perp}$  zur totalen Fluoreszenzintensität definiert. Hierbei darf  $r$  nicht mit dem Dipolmoment  $r_a/r_b$  verwechselt werden:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.19)$$

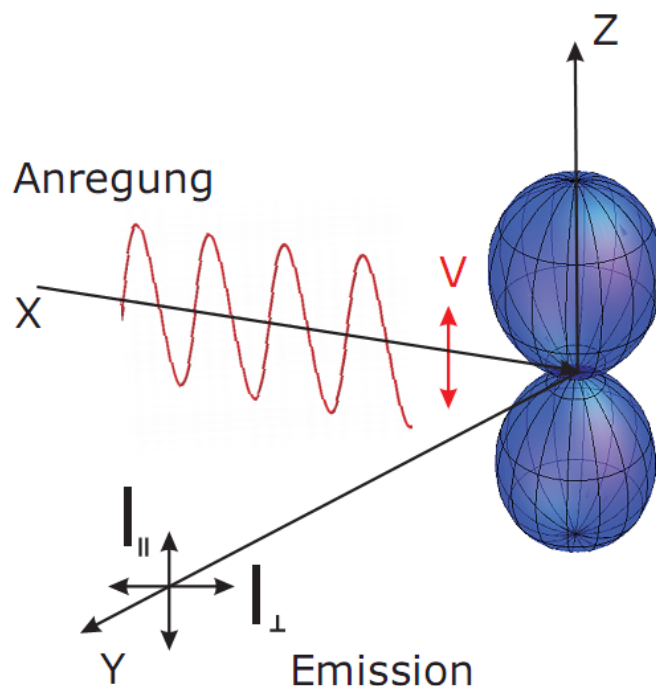


Abbildung 2-5 Schematische Darstellung für das Messen der Anisotropie von immobilisierten, zufällig verteilten Fluorophoren in einem klassischen 90°-Aufbau; die blaue Hantel ist die Polarkoordinatendarstellung der Verteilung der Emissionsdipolmomente der photoselektierten Fluorophore bei Anregung mit vertikal polarisiertem Licht V (Absorptions- und Emissionsdipolmoment sind parallel).

Parallel und senkrecht beziehen sich hierbei auf die Ausrichtung eines Analysators (Emissionspolarisator) zur Anregungspolarisation des Lichts. In Abbildung 2-5 ist dies graphisch in einem Koordinatensystem dargestellt.

Ein angeregter Fluorophor kann als strahlender Dipol betrachtet werden; ist dieser Dipol in einem kartesischen Koordinatensystem entlang der z-Achse orientiert, strahlt er rotations-

symmetrisch in Richtung der x und y-Achse ab, nicht jedoch entlang der z-Achse. Werden nun zufällig orientierte Moleküle in Lösung mit linear polarisiertem Licht angeregt, so hängt ihre Anregungsrate davon ab, welchen Winkel ihre Absorptionsdipolmomente mit dem E-Vektor des polarisierten Lichts bilden. Für Moleküle, die parallel zum E-Vektor ausgerichtet sind, ist die Absorptionswahrscheinlichkeit am größten, senkrecht dazu ausgerichtete Moleküle absorbieren nicht. Man kann dies auch mit einem Bild aus der Elektrotechnik beschreiben: Das ausgerichtete Molekül (bzw. Dipolmoment) fungiert als Empfängerantenne und das Licht ist eine Radiowelle. Betrachtet man ein einzelnes Molekül (parallele Absorptions- und Emissionsdipolmomente), ist die Amplitude der Anregung proportional zur Projektion des Absorptionsdipolmoments des Fluorophors auf den E-Vektor des Lichts:

$$A = E_0 \cos(\theta) \quad (2.20)$$

$A$  ist die Amplitude der Anregung,  $E_0$  ist die Amplitude der elektrischen Feldstärke und  $\theta$  der Winkel zwischen Absorptionsdipolmoment und Feldvektor. Die Absorptionsrate oder Intensität  $I$  ist dann durch das Quadrat von Gleichung 2.20 gegeben:

$$I = E_0^2 \cos^2(\theta) \quad (2.21)$$

Die graphische Darstellung dieser Winkelabhängigkeit der Absorptionsrate ist in Abbildung 2-5 als hantelförmige Form zu erkennen, wie sie bei der Auftragung der Intensität  $I$  in Kugelkoordinaten entsteht. Die relative Größe von  $I$  bei einem bestimmten  $\theta$  ist die Länge eines Vektors vom Ursprung bis zur Hanteloberfläche. Den Prozess der winkelabhängigen Absorption nennt bei der Anregung von zufällig orientierten Molekülen in Lösung auch die sogenannte PhotoSelektion. Die Dipolmomente der Moleküle sind in unterschiedlichen Winkeln zum E-Vektor des Lichts orientiert, es kommt daher bei der Anregung zu einer Verteilung der angeregten Moleküle, die z.B. wie in Abbildung 2-5 dargestellt werden kann.

Betrachtet man nun statt eines einzelnen Moleküls ein Ensemble von Fluorophoren, ist die Intensität, die man im parallelen Kanal  $I_{\parallel}$  misst, proportional zum Quadrat der Projektion der Emissionsdipolmomente auf die Beobachtungs-Achse (Z-Achse, hier identisch mit der Richtung des E-Vektors),  $\langle \cos^2(\theta) \rangle$  gibt hier eine Mittelung über alle Orientierungen der Moleküle zur Z-Achse an:

$$I_{\parallel} \propto \langle \cos^2(\theta) \rangle \quad (2.22)$$

Beim senkrechten Kanal  $I_{\perp}$  entspricht die Intensität nach einigen Vereinfachungen:

$$I_{\perp} \propto \frac{1}{2} \langle \sin^2(\theta) \rangle = \frac{1}{2} (1 - \langle \cos^2(\theta) \rangle) \quad (2.23)$$

Setzt man 2.22 und 2.23 in 2.19 ein, so ergibt sich eine  $\cos^2(\theta)$  –Abhängigkeit der Anisotropie:

$$r = \frac{1}{2} (\langle 3\cos^2(\theta) \rangle - 1) \quad (2.24)$$

Für die Berechnung der Anisotropie müssen dann die Mittelwerte der Winkel -  $\langle \cos^2(\theta) \rangle$  und  $\langle \sin^2(\theta) \rangle$  - betrachtet werden. Dabei muss die durch PhotoSelektion erzeugte Verteilung ebenfalls mitberücksichtigt werden. Die Mittelwerte können mit Hilfe der Verteilungsfunktion  $f(\theta)d\theta = \cos^{2n}(\theta)\sin(\theta)d\theta$  berechnet werden:

$$\langle \cos^2(\theta) \rangle = \frac{\int_0^{\pi/2} \cos^2(\theta) f(\theta) d\theta}{\int_0^{\pi/2} f(\theta) d\theta} \quad (2.25)$$

Die Gleichung ergibt sich aus der PhotoSelektion ( $\cos^{2n}(\theta)$  bei parallelen Absorptions- und Emissionsdipolmomenten) und der Anzahl der Moleküle im Kugelvolumenelement  $\sin(\theta)d\theta$ . Hierbei gibt  $n$  die Anzahl der Photonen an, die zur Anregung benutzt werden. Bei Multiphotonenabsorption gilt diese Formel aber nur für den Fall, dass ein einzelnes Element den Zweiphotonentensor dominiert und der Tensor parallel zu einer der Symmetrieachsen des Moleküls liegt. Auf die speziellen Eigenschaften der Multiphotonenanisotropie wird im Rahmen von Abschnitt 2.5 genauer eingegangen.

Da die Anisotropie der Fluoreszenz gemessen wird, hängt die Anisotropie nicht nur von der Ausrichtung der Absorptionsdipolmomente ab, sondern die Ausrichtung der Emissionsdipolmomente bestimmt die Größe der Anisotropie. Ist diese nicht parallel zu den Absorptionsdipolmomenten, sondern in einem bestimmten Winkel, muss die Verteilung der Dipolmomente anders als in Abbildung 2-5 dargestellt werden. Bei einem Winkel von  $90^\circ$  ergibt sich z.B. eine  $\sin^2(\theta)$ -Verteilung, d.h. die Verteilungsfunktion ist  $f(\theta)d\theta = \sin^2(\theta)\sin(\theta)d\theta$ . Die Polarkoordinaten-Darstellung von  $\sin^2(\theta)$  ist in Abbildung 2-6 dargestellt.

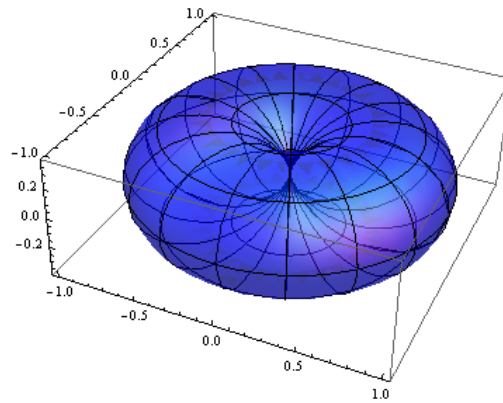


Abbildung 2-6 Verteilung der Emissionsdipolmomente bei Anregung mit vertikal polarisiertem Licht wie in Abbildung 2-5 und senkrechten zueinander stehenden Dipolmomenten.

Unter diesen Voraussetzungen ist die allgemeine Formel für die (lineare) Anisotropie  $r$  von immobilisierten zufällig orientierten Molekülen in Lösung:

$$r(\alpha) = \frac{2n}{2n+3} \frac{1}{2} (3\cos(\alpha)^2 - 1) \quad (2.26)$$

In Abbildung 2-7 ist die obige Gleichung für  $n = 1(OPE)$  und  $n=2(TPE)$  in Polarkoordinatenform dargestellt.

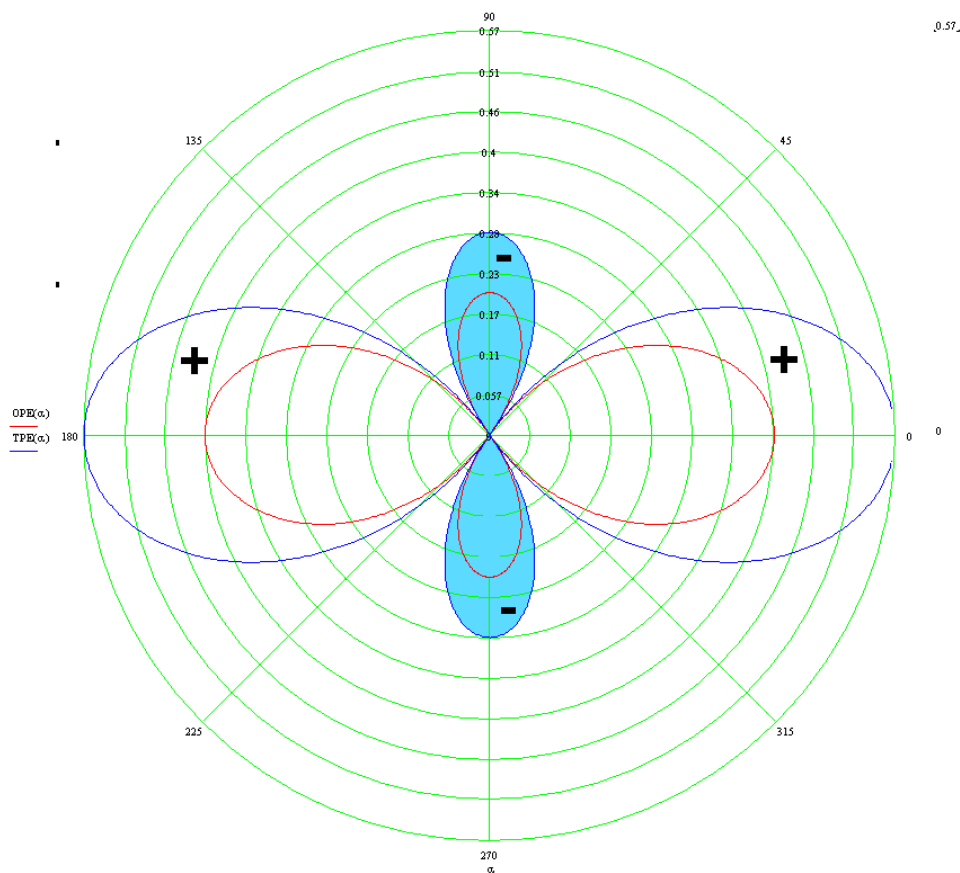


Abbildung 2-7 Polarkoordinaten Darstellung von Gleichung 2.26 für Einphotonen (OPE) und Zweiphotonenanregung(TPE), für  $\alpha > 54.7^\circ$  sind die Anisotropiewerte als negativ abzulesen(blaue Flächen).

Hierbei ist  $n$  die Anzahl der Photonen und  $\alpha$  beschreibt den Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment. In der Tabelle 2-3 sind exemplarisch die Werte von  $r(\alpha)$  für verschiedene Werte von  $\alpha$  und  $n$  aufgeführt. Es sei an dieser Stelle nochmals angemerkt, dass die Zahlenwerte für  $n > 1$  nur gültig bei einfachen (Einzelement) Multiphotonentensoren sind.

**Tabelle 2-3 Beispielwerte für die Anisotropie bei unterschiedlichen Winkeln zwischen Absorptionsdipolmoment und Emissionsdipolmoment für ein und mehrere Photonen.**

Winkel $\alpha$	Anzahl Photonen	$r(\alpha)$
<b>0</b>	1	0.4
	2	0.5714
	3	0.667
<b>45</b>	1	0.1
	2	0.143
	3	0.167
<b>54.7</b>	1	0
	2	0
	3	0
<b>90</b>	1	-0.2
	2	-0.286
	3	-0.333

Der maximale Wert der Anisotropie liegt bei 1. Dieses ist nur der Fall bei vollkommen entlang der Polarisationsachse des Lichts ausgerichteten Molekülen, wie es zum Beispiel bei Fluorophoren in Kristallform oder in Polymerfolien [61] vorkommt. Negative Werte kann die Anisotropie annehmen, wenn Absorptionsdipolmoment und Emissionsdipolmoment nicht parallel zu einander sind. Für alle in Tabelle 2-3 dargestellten Werte von  $r$  gilt, dass sie theoretische Grenzwerte sind, die in der Praxis für nicht zeitaufgelösten Messungen nur bei tiefen Temperaturen in glasartigen Medien gemessen werden können. Nur dann sind die Moleküle weitestgehend unbeweglich, so dass zwischen der Absorption eines Photons und der Emission eines anderen Photons keine Rotationen stattfinden. Finden dagegen Rotationen statt, dann ist die gemessene Anisotropie deutlich reduziert. Ein weiterer Faktor, der bei der Messung von Anisotropien beachtet werden muss, ist die Konzentration des Fluorophors. Bei zu hohen Konzentration kann es zu intramolekularem resonanten Energietransfer kommen [62,63]. Je nach Größe des Überlappungsintegrals von Absorptions- und Emissionsspektrum kommt es ab Konzentrationen von 1 mmol/L zur Reduzierung der Anisotropie.

In der Literatur sind eine Vielzahl von Einphotonenanisotropien für verschiedenste Moleküle bekannt [60]. Multiphotonenanisotropien wurden aufgrund der deutlich anspruchsvolleren Technik dagegen kaum gemessen [64–66].



### 2.4.1 Zeitabhängige Anisotropiemessungen

Im vorhergehenden Abschnitt wurde davon ausgegangen, dass die angeregten Moleküle zwar zufällig verteilt, aber zeitlich immobilisiert sind. Das bedeutet, dass zwischen der Anregung und der Emission keine Rotation der Moleküle stattfindet. Die Verteilungsfunktion der Dipolmomente ist also zeitlich konstant. Findet zwischen der Absorption und Emission eines Photons Rotation der Moleküle statt, ändert sich die relative Orientierung der Emissionsdipolmomente. Für mathematisch exakte Beschreibung dieser zeitabhängigen Änderung der Orientierung (gleichbedeutend mit einer Änderung der Anisotropie) sind komplexe Betrachtungen über die Rotation von Molekülen nötig.

Es müssen zwei Arten der Rotation unterschieden werden: Die molekulare freie Eigenrotation wie sie z.B. durch Anregung von Molekülen in der Gasphase bei niedrigen Drücken stattfindet und die zufällige Reorientierung der Moleküle in Lösungen durch Stöße mit Lösungsmittelmolekülen, auch Rotationsdiffusion genannt [67].

Die zeitliche Beschreibung der Abnahme der Anisotropie, d.h. die zeitliche Entwicklung der durch Photoselektion erzeugten Verteilung, ergibt sich durch aus der Lösung der Fickschen partiellen Differentialgleichungen für Rotationsdiffusion [68]. Es wird davon ausgegangen, dass nach einer Reihe von zufälligen Diffusions-Rotationsbewegungen keine Anisotropie mehr zu messen ist; die partielle Orientierung der Dipolmomente, die durch die Photoselektion zustande gekommen ist, wird durch die Stöße mit Lösemittel-Molekülen vollkommen aufgehoben. Dabei treten im allgemeinen Fall für asymmetrische Moleküle fünf zeitliche Konstanten auf; die Depolarisation der Fluoreszenz bzw. der Zerfall der Anisotropie  $r$  kann dann als Summe von Exponentialfunktionen beschrieben werden:

$$r(t) = \sum_{i=1}^5 r_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_{rot_i}}\right) \quad (2.27)$$

Die Anisotropie  $r(0)$  zum Zeitpunkt  $t=0$  (auch Anfangsanisotropie genannt) ist äquivalent zur Anisotropie  $r$ , die nicht zeitaufgelöst in glasartigen oder gefroren Proben gemessen wird. Die  $r_i$  lassen sich berechnen, sie hängen vom Winkel der Absorptions- und Emissionsdipolmomente zu den Symmetrieachse des Moleküls ab [69]. Die Rotationskorrelationszeiten  $\tau_{rot}$  lassen sich aus den Summen der Rotationsdiffusionskoeffizienten berechnen. Für asymmetrische Moleküle gibt es drei dieser Koeffizienten. Da aber jeweils zwei Paare der Korrelationszeiten relativ ähnlich sind, lassen nicht mehr als drei Rotationszeiten zeitlich auflösen [69]. Eine weitere Simplifizierung ergibt sich durch die Betrachtung von Molekülen als Rotations-

ellipsoid. Dieser hat prinzipiell drei unterschiedliche Längachsen und drei Rotationsdiffusionskoeffizienten, im vereinfachten Fall jedoch nur zwei unterschiedliche Längachsen und Diffusionskoeffizienten:  $D_{\parallel}$  für die Drehung um die Symmetrieachse und  $D_{\perp}$  senkrecht dazu (s. auch [60]). Die Diffusionskoeffizienten sind Funktionen der Viskosität des Lösemittels und der Form der gelösten Moleküle. In Abbildung 2-8 sind Darstellungen dieser vereinfachten Ellipsoide zu sehen.

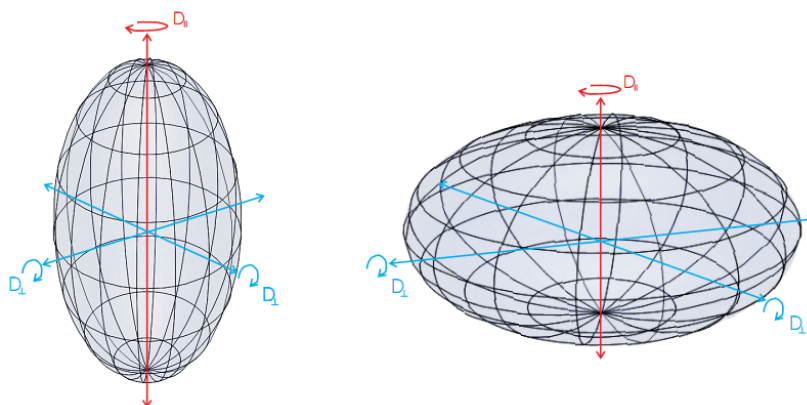


Abbildung 2-8 Rotationsellipsoide: links prolater Ellipsoid, rechts oblater Ellipsoid.

Viele elektronische Übergänge liegen aus Symmetriegründen innerhalb der Molekülebene, d.h. die Dipolmomente fallen mit den Symmetrieachsen/Diffusionsachsen zusammen. Die zeitliche Beschreibung der Änderung der Anisotropie vereinfacht sich weiter. Für die oben dargestellten Ellipsoide gilt dann (Einphotonenabsorption) [60]:

Prolater Ellipsoid (Absorption- und Emissionsdipolmoment parallel zur langen Achse):

$$r(t) = 0.4 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{rot1}}\right) \quad (2.28)$$

Oblater Ellipsoid (Absorption- und Emissionsdipolmoment parallel zur langen Achse):

$$r(t) = 0.3 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{rot2}}\right) + 0.1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{rot1}}\right) \quad (2.29)$$

Die Rotationszeit  $\tau_{r1}$  ist  $1/(6D_{\perp})$  und  $\tau_{r2}$  entspricht  $1/(4D_{\parallel} + 2D_{\perp})$ . Da  $D_{\parallel}$  größer als  $D_{\perp}$  ist, ist  $\tau_{r2}$  meist deutlich kleiner als  $\tau_{r1}$ . Für kleinere Molekülen wie Indol oder PTP bewegen sich die Rotationskorrelationszeiten in niedrigviskosen Medien wie Cyclohexan im Bereich von unter 100 ps. Die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle werden als vereinfachte Ellipsoide angenähert: PTP ist als langgestrecktes Molekül ein prolater Ellipsoid, und Indol und PPD eher oblate Ellipsoide.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die beschriebenen Beziehungen zwischen Diffusionskoeffizienten und Rotationskorrelationszeiten nur für „Stick-Diffusion“ gelten. Dabei wird

angenommen, dass sich die Lösemittelmoleküle in der ersten Schicht um den Fluorophor bei der Drehung mit bewegen. Das Gegenstück dazu ist die „Slip-Diffusion“, bei der nahezu freie Rotation ohne Lösemittelbewegung stattfindet. Bei freier Rotation wird die Rotation nur durch das Trägheitsmoment limitiert. Bei freier Rotation ohne Stöße mit anderen Molekülen sinkt die Anisotropie nicht auf null ab, sondern nähert sich einem konstanten Wert an[70]. Die Rotationskorrelationszeiten liegen dabei im Bereich von 10 bis 20 ps. Bei Molekülen in Lösung wird freie Rotation nur in den ersten 50 ps nach der Anregung bei sehr hoher Zeitauflösung beobachtet [71]. Als Konkurrenzprozess zu freier Rotation gibt es zu größeren Zeiten nach der Anregung auch Rotationsdiffusion, bzw. Stöße mit Lösemittelmolekülen, so dass eine theoretisch vorhergesagte Restanisotropie vermutlich nur in Gasphase (bei niedrigen Drücken) gemessen werden kann.

## 2.5 Polarisationsabhängigkeit der Zweiphotonenabsorption

Bei der Betrachtung der Auswahlregeln und der Übergänge für Einphotonabsorption ergibt sich bei Bildung der Mittelung über alle Orientierungsrichtungen des Dipolmomentes **keine** Polarisationsabhängigkeit des Absorptionsquerschnittes. Für  $\langle \sigma \rangle$  wird für jede Polarisation (linear, zirkular etc.) der gleiche Wert gemessen. Bei OPE ist die Polarisationsabhängigkeit nur bei angeordneten Molekülen (Kristallen) gegeben. Wenn bekannt ist, wie die Moleküle im Kristall orientiert sind, können die einzelnen Komponenten des Übergangsdipolmoments in Laborkoordinaten angegeben werden, indem der Kristall in die entsprechenden Richtungen der Laborkoordinaten dreht [72].

Analog zur Gleichung für den OPE-Absorptionsquerschnitt (Gleichung 2.13) lässt sich für den Zweiphotonenquerschnitt folgende Formel angeben [3]:

$$\delta \propto |\mu \cdot S^{fi} \cdot \lambda|^2 \quad (2.30)$$

Der Zweiphotonenquerschnitt  $\delta$  ist proportional zur Doppelprojektion von zwei Polarisationsvektoren auf einen Tensor (Matrix). Die Größe  $S^{fi}$  ist ein Tensor zweiter Ordnung, den man als analoge Größe zum Übergangsdipolmoment betrachten kann; hier für einen Übergang vom Grundzustand  $i$  in Endzustand  $f$ . Die Polarisierungen der zwei Photonen sind  $\lambda$  und  $\mu$  in Laborkoordinaten. Beschreibt man das Übergangsdipolmoment als dreidimensionalen Vektor (x,y,z) in kartesischen Molekülkoordinaten, so kann man den Tensor als 3x3-Matrix beschreiben:

$$S^{fi} = \begin{bmatrix} S_{xx} & S_{xy} & S_{xz} \\ S_{yx} & S_{yy} & S_{yz} \\ S_{zx} & S_{zy} & S_{zz} \end{bmatrix} \quad (2.31)$$

Die einzelnen Elemente des Tensors können als Produkte von Übergangsdipolmomenten betrachtet werden. Ausformuliert schreibt man die Absorptionsrate dann als Summe der Produkte der Polarisationskomponenten der Photonen in Richtung x, y, z und der Tensorelemente  $S_{xx}$  etc. (s. Callis in [35]):

$$\delta \propto |S_{xx}xx + S_{xy}xy + S_{xz}xz + S_{yx}yx + S_{yy}yy + S_{yz}yz + S_{zx}zx + S_{zy}zy + S_{zz}zz|^2 \quad (2.32)$$

Bei der Bezeichnung der Koordinaten muss zwischen Laborkoordinaten und Molekülkoordinaten unterschieden werden. Gleichwertig können sie nur bei in angeordneten Molekülen werden (z.B. Kristallen).

Die kartesischen Elemente  $S_{ab}^{fi}$  des Zweiphotonentensors kann man ähnlich wie die des Übergangsdipolmoments berechnen. Für unterschiedliche Photonen der Energien  $E_\lambda$  und  $E_\mu$  gilt:

$$S_{ab}^{fi} = \sum_e \left( \frac{\langle f | \mathbf{r}_a | e \rangle \langle e | \mathbf{r}_b | i \rangle}{\Delta E_e - E_\mu} + \frac{\langle f | \mathbf{r}_b | e \rangle \langle e | \mathbf{r}_a | i \rangle}{\Delta E_e - E_\lambda} \right) \quad (2.33)$$

Die obige Gleichung beschreibt einen Übergang vom Grundzustand  $i$  (*initial state*) über den intermediären Zustand  $e$ , in den Endzustand  $f$  (*final state*).  $\Delta E_e$  ist die Energiedifferenz zwischen intermediärem Zustand und Grundzustand. Die Variablen  $\mathbf{r}_a$  und  $\mathbf{r}_b$  sind die Dipoloperatoren in Richtung  $a$  und  $b$ . Die Berechnung der Elemente erfolgt durch Aufsummierung über die Zahl aller intermediären Zustände  $e$ . Dies können prinzipiell alle Zustände des Moleküls sein, deren Beitrag durch die energetische Differenz im Nenner von Gleichung 2.33 gewichtet wird. Daraus ergibt sich auch, dass die Größe und die Relation der einzelnen Elemente von der Frequenz der zwei eingestrahnten Photonen abhängig sind.

Aus der Form dieser Gleichung lassen sich eine Reihe von Schlussfolgerungen ziehen. Die Auswahlregeln für Zweiphotonenübergänge sind anders als für Einphotonenübergänge: Die Zweiphotonenanregung erfolgt zwar nicht stufenweise, die Interaktion der Photonen ist simultan. Aber bei Molekülen mit Zuständen gerader und ungerader Symmetrie lässt sich der Übergang  $f \leftarrow i$  als Übergang von einem Grundzustand *gerader* Symmetrie in einen intermediären Zustand *ungerader* Symmetrie, gefolgt von einem zweiten Übergang in einen Zustand *gerader* Symmetrie veranschaulichen. Insgesamt sind daher für TPE nur Übergänge zwischen Zuständen gleichen Parität erlaubt ( $g \leftarrow g$ ,  $u \leftarrow u$ ), die Pseudoparitätsauswahlregel ist  $(+) \leftarrow (-)$ .

Findet eine Anregung mit zwei Photonen gleicher Energie statt, dann vereinfacht sich der Zweiphotonentensor: Der Tensor ist für alle Übergänge symmetrisch, d.h. die Elemente  $S_{xy}$  und  $S_{yx}$  usw. haben immer die gleiche Größe. Dieses hat bestimmte Auswirkungen auf das Zuordnen von Symmetrien angeregter Zustände, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

Aus Symmetriebetrachtungen und Blick in die Charaktertafeln lassen sich Rückschlüsse auf die sogenannte irreduzible Form eines Zweiphotonen-Tensors ziehen. Bei Wirth *et al.* [72] sind eine Reihe von anschaulichen Beschreibungen für das Form eines Tensor („tensor pattern“) bei einem bestimmten Übergang und Punktgruppe zu finden: Der Tensor für einen totalsymmetrischen Übergang ( $A_{1g} \leftarrow A_{1g}$ ) bei einem Molekül oktaedrischer Symmetrie lässt sich als (3x3)-Diagonalmatrix schreiben. Aufgrund der Symmetrie sind alle Achsen äquivalent, d.h. alle Diagonalelemente haben die gleiche Größe. Für  $C_{2h}$  haben die Funktionen  $xx$ ,  $yy$ ,  $zz$ , und  $xy$  die Symmetrie  $A_g$ ,  $yz$  und  $xz$  weisen  $B_g$  auf. Die irreduzible Form der entsprechenden Tensoren ist daher:

$$A_g \leftarrow A_g = \begin{bmatrix} S_1 & S_4 & 0 \\ S_5 & S_2 & 0 \\ 0 & 0 & S_3 \end{bmatrix} \quad B_g \leftarrow A_g = \begin{bmatrix} 0 & 0 & S_6 \\ 0 & 0 & S_7 \\ S_9 & S_8 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.34)$$

Diese irreduziblen Formen der Tensoren ergeben sich durch gruppentheoretische Behandlung des Zweiphotonentensors  $S^{fi}$ . Dieses wurde von McClain bei allen 32 Punktgruppen für die erlaubten Zweiphotonenübergänge durchgeführt [43].

Genauso wie bei der Einphotonenabsorption, gilt auch für die Zweiphotonenabsorption, dass für Messungen von zufällig orientierten Molekülen in Lösungen der mittlere Querschnitt  $\langle \delta \rangle = \langle |\mu \cdot S^{fi} \cdot \lambda|^2 \rangle$  gebildet werden muss, d.h. es muss über alle Orientierungen der Moleküle zu den Laborachsen gemittelt werden.

Diese Mittelung lässt sich entweder über Kosinustransformationen der Molekülkoordinaten in Laborkoordinaten durchführen, wie es zuerst von Monson und McClain [42] und später detaillierter von anderen demonstriert wurde [73]. Eine mathematisch andere Möglichkeit den Mittelwert aller Orientierungen zu berechnen, ergibt sich durch Transformation in sphärische Kugelkoordinaten, d.h. hier werden alle Dipolmomente als sphärischen Tensoren beschrieben. Die allgemeinste Formulierung wurde zuerst von Wan und Johnson [74,75] durchgeführt. Andere Methoden basieren auf irreduziblen Tensoren [76,77]. Ryderfors *et al.* [76] stellten experimentell hilfreiche Beziehungen zwischen der Beschreibung der durch TPE induzierten Anisotropie in kartesischen und irreduziblen Tensoren her. Shternin und Vasyutinskii [78] gingen entsprechend Wan vor und erzielten analoge Ergebnisse wie dieser. Die Benutzung

von sphärischen/irreduziblen Tensoren hat viele Vorteile bei der Beschreibung von Rotationsdiffusion, diese lässt sich mit Hilfe sphärischer Koordinaten mathematisch übersichtlicher formulieren.

Hier soll zunächst die Theorie und der experimentelle Bezug der Methode nach McClain beschrieben werden. Nach dem Mitteln über alle Orientierungen ergibt sich, dass der Absorptionsquerschnitt als Funktion der Polarisierung der Anregungsphotonen ( $F$ ,  $G$ ,  $H$ ) und dreier molekularer Parameter ( $\delta_F$ ,  $\delta_G$ ,  $\delta_H$ ) beschrieben werden kann:

$$\langle \delta \rangle = \delta_F F + \delta_G G + \delta_H H \quad (2.35)$$

Mit  $F$ ,  $G$  und  $H$  als Funktionen der Polarisierungen  $\mu$  und  $\lambda$  (als komplexe Einheitsvektoren) der Anregungsphotonen:

$$F = 4|\lambda \cdot \mu|^2 - 1 - |\lambda \cdot \mu^*|^2; \quad (2.36)$$

$$G = -|\lambda \cdot \mu|^2 + 4 - |\lambda \cdot \mu^*|^2;$$

$$H = -|\lambda \cdot \mu|^2 - 1 + 4|\lambda \cdot \mu^*|^2$$

Durch die Mittelung lassen sich nicht mehr alle Elemente des Tensors genau bestimmen. Die von McClain definierten Parameter sind jedoch Funktionen der Tensorelemente, so dass aus dem Verhältnis der drei Parameter Rückschlüsse über die Symmetrie des angeregten Zustands gezogen werden können.

Gemäß McClain ist  $\delta_F$  der Indikator-Parameter für einen Übergang in einen totalsymmetrischen Zustand, er ist proportional zur Spur der Tensorelemente zum Quadrat.  $\delta_G$  ist die Summe aller Tensorelemente zum Quadrat,  $\delta_H$  ist die Summe über die Produkte der Tensorelemente mit ihrem komplex konjugierten Transponierten. Für einen nicht totalsymmetrischen Übergang ist  $\delta_F$  immer null. Das Verhältnis von  $\delta_G$  und  $\delta_H$  zeigt, ob ein Tensor antisymmetrisch, symmetrisch oder nicht symmetrisch ist. In verkürzter Schreibweise nach Einstein ergibt sich:

$$\delta_F = S_{aa}S_{bb}; \delta_G = S_{ab}S_{ab}^*; \delta_H = S_{ab}S_{ba}^* \quad (2.37)$$

Die Variablen  $a$  und  $b$  in Gleichung 2.37 laufen über die Indizes  $x, y, z$ . Gleiche Indizes bedeuten hier eine Aufsummierung.

McClain führte eine Liste von 5 Fällen auf, mit der sich in den meisten Fällen bei bekannter Punktgruppe eines Moleküls nach der Messung von  $\delta_F$ ,  $\delta_G$  und  $\delta_H$  die Symmetrie des angeregten

Zustandes bestimmen lässt [43]. Beispielsweise sind bei allen totalsymmetrischen Übergängen  $\delta_F$ ,  $\delta_G$  und  $\delta_H$  positiv. In Tabelle 2-4 sind eine Reihe von Beispielen von Tensor-Formen gegeben, die nach symmetrisch, antisymmetrisch etc. klassifiziert sind.

**Tabelle 2-4 Beispiele für Tensor-Formen von verschiedenen Punktgruppen.**

$A_g \leftarrow A_g$	$A_g \leftarrow A_g$	$A_{2g} \leftarrow A_g$	$B_g \leftarrow A_g$
$\begin{bmatrix} S_1 & S_4 & 0 \\ S_5 & S_2 & 0 \\ 0 & 0 & S_3 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} S_1 & 0 & 0 \\ 0 & S_2 & 0 \\ 0 & 0 & S_3 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 0 & -S_1 & 0 \\ S_1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 0 & S_1 & 0 \\ S_1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$
Nicht symmetrisch ( $C_{2h}$ )	symmetrisch ( $D_{2h}$ )	Antisymmetrisch ( $D_{6h}$ )	symmetrisch ( $D_{2h}$ )
$\delta_F \geq 0, \delta_G \geq \delta_H$	$\delta_F \geq 0, \delta_G = \delta_H$	$\delta_F = 0, \delta_G = -\delta_H$	$\delta_F = 0, \delta_G = \delta_H$

Wichtig ist hier anzumerken, dass nicht symmetrische/antisymmetrische Tensoren gemäß Gleichung 2.33 nur bei Anregungen mit zwei Photonen unterschiedlicher Wellenlänge auftreten. Übergänge, die durch solche Tensoren charakterisiert werden, können durch reine Absorptionsmessungen mit identischen Photonen nicht unterschieden werden [7]. Für Anregungen mit identischen Photonen sind  $\delta_G$  und  $\delta_H$  gleich (s. Gleichung 2.37). Diese Tensoren manifestieren sich jedoch nur bei stark unterschiedlichen Wellenlängen der beiden Photonen. Einige Übergänge ( $A_2 \leftarrow A_g$ ) sind für gleiche Photonen verboten und können nur mit Photonen unterschiedlicher Frequenz angeregt werden [72].

Ursprünglich nur auf reine Absorptionsmessungen bezogen, sind die relativen Größen der McClain-Parameter auch in Fluoreszenzexperimenten messbar, jedoch nur wenn die totale Fluoreszenzintensität, d.h. Fluoreszenz ohne Einfluss von Anisotropie gemessen wird (siehe auch Abschnitt 2.4). Wenn die Rotationskorrelationszeit im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer vergleichbar klein ist (1 ns zu 10 ps) ist der Einfluss der Fluoreszenzanisotropie auf die Messung der Parameter jedoch sehr gering.

Aus Gleichung 2.35 ergibt sich, dass man durch Messen der Absorption bzw. Fluoreszenzintensität  $\langle \delta \rangle$  bei drei verschiedenen Kombination von zwei Polarisationen  $\lambda$  und  $\mu$  der Photonen die McClain-Parameter  $\delta_i$  ( $i \triangleq F, G, H$ ) und damit die Symmetrie des angeregten Zustands bestimmen kann. Trägt man die Messwerte  $\langle \delta \rangle$  für die simplen Polarisationskombinationen *linear parallel*, *linear gekreuzt*, *zirkular gleichsinnig*, *zirkular gegensinnig* in einem Koordinatensystem auf, bei dem  $|\lambda \cdot \mu^*|^2$  die x-Achse (von 0 bis 1),  $|\lambda \cdot \mu|^2$  die y-Achse (von 0 bis 1) und  $\langle \delta \rangle$  die z-Achse sind, wird eine Ebene (über)definiert. Durch Anpassen einer Fit-Funktion an die Daten werden dann die  $\delta_i$  erhalten (s. auch Abschnitt 5.4.1 für die graphische Darstellung).

Zu angeregten Zuständen von Molekülen bestimmter Punktgruppen (wie z.B.  $D_{2h}$  Naphtalin, Anthracen etc.) gehören nur totalsymmetrische ( $A_g$ ) oder nicht totalsymmetrische Tensoren ( $B_{1g}$ ,  $B_{2g}$ ,  $B_{3g}$ ). Eine charakteristische Größe, die Bestimmung der Symmetrie des angeregten Zustands durch einfache Zweiphotonen-Messungen (mit einer Farbe) erlaubt, ist das „Zweiphotonen-Polarisations-Verhältnis“  $\Omega$ . Es ist als das Verhältnis der totalen Intensität bei zirkularer gleichsinniger Anregung ( $I_{cir\ co}$ ) und der totalen Intensität bei linear parallelen Photonen ( $I_{lin\ par}$ ) definiert und lässt sich auch über Kombinationen der McClain-Parameter beschreiben:

$$\Omega = \frac{I_{cir\ co}}{I_{lin\ par}} = \frac{-2\delta_F + 3\delta_G + 3\delta_H}{+2\delta_F + 2\delta_G + 2\delta_H} \quad (2.38)$$

Für Einphotonenübergänge in Lösungen ist dieser Parameter aufgrund der nicht vorhandenen Polarisationsabhängigkeit des Querschnitts immer 1. Für Zweiphotonen-Übergänge von einem totalsymmetrischen Grundzustand in einen totalsymmetrischen angeregten Zustand ( $A_g$ ,  $A_1$ ,  $A$ ) ergeben sich je nach Größe von  $\delta_F$  Werte zwischen 0 und 1.5. Für Tensoren, die von einem einzigen Diagonalelement dominiert werden, ergibt sich ein Wert von 2/3. Für nicht-totalsymmetrische Übergänge ist  $\delta_F$  null, d.h.  $\Omega$  ist immer 1.5. Liegt ein gemessener Wert  $\Omega$  nahe 1.5 so deutet das bei Molekülen der  $D_{2h}$ -Punktgruppe auf einen angeregten Zustand mit  $B_g$  Symmetrie an.

Der Parameter  $\Omega$  wurde für eine Vielzahl von aromatenähnlichen Molekülen über große spektrale Bereiche gemessen [1]. Für genaue Zuordnungen und Voraussagen über die Größe und das Verhältnis der Tensorelemente zueinander ist der Parameter nur bedingt geeignet. Johnson, Wan und Callis legten anschaulich dar, welche Werte von  $\Omega$  man für bestimmte Arten von Tensoren erwarten kann [35,79].

Für viele Übergänge lässt sich der ursprünglich dreidimensionale Tensor auf zwei Dimensionen reduzieren (2x2-Matrix), da der Tensor hauptsächlich durch Übergänge in der Molekülebene charakterisiert wird (in der hier benutzten Nomenklatur die zx-Ebene, alle y-Elemente sind 0). In Abbildung 2-9 sind die Werte von  $\Omega$  für verschiedene Verhältnisse von  $S_{xx}$  und  $S_{zz}$  aufgetragen.  $S_{zz}$  entspricht der Haupttensorachse.  $S_{xz}/S_{zx}$  sind 0 (Diagonaltensor).



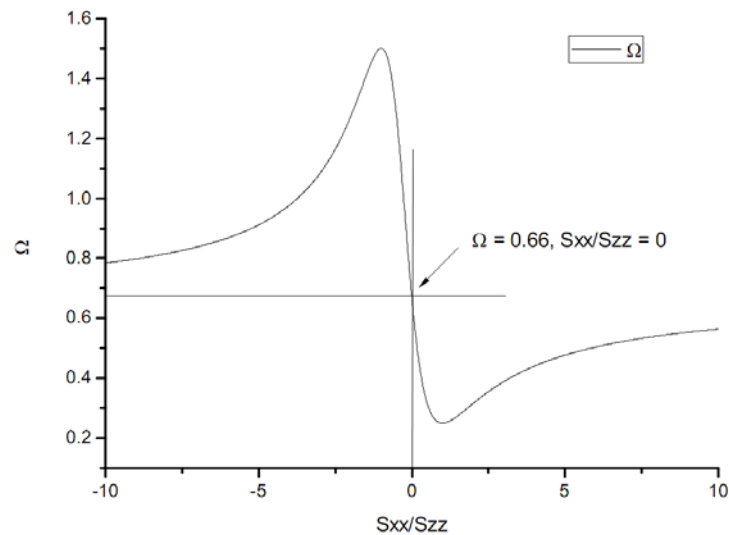


Abbildung 2-9 Zweiphotonenpolarisationsverhältnis für verschiedene Verhältnisse der Zweiphotonentensorelemente  $S_{xx}$  und  $S_{zz}$  (s. auch Johnson et al in [35]).

Dominiert ein einzelnes Element den Tensor, d.h.  $S_{zz} \gg S_{xx}$ , so beträgt der Wert für  $\Omega$  wie oben beschrieben ca.  $2/3$ . Für dreidimensionale Diagonaltensoren ergibt sich ein Falschfarbenbild von  $\Omega$ , bei dem die Verhältnisse von  $S_{xx}/S_{zz}$  und  $S_{yy}/S_{zz}$  die „Ortskoordinaten“ von  $\Omega$  festlegen und die Farbe den Wert von  $\Omega$  kodiert. Dies ist in Abbildung 2-10 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass für bestimmte Verhältnisse der Tensorelemente auch Werte von 0 für  $\Omega$  möglich sind. Dies tritt auf, wenn alle Tensorelemente den gleichen Wert haben. Dies ist z.B. bei totalsymmetrischen Übergängen in Molekülen mit oktaedrischer Symmetrie der Fall. Es bedeutet gleichzeitig auch, dass zirkular polarisiertes Licht nicht absorbiert wird.

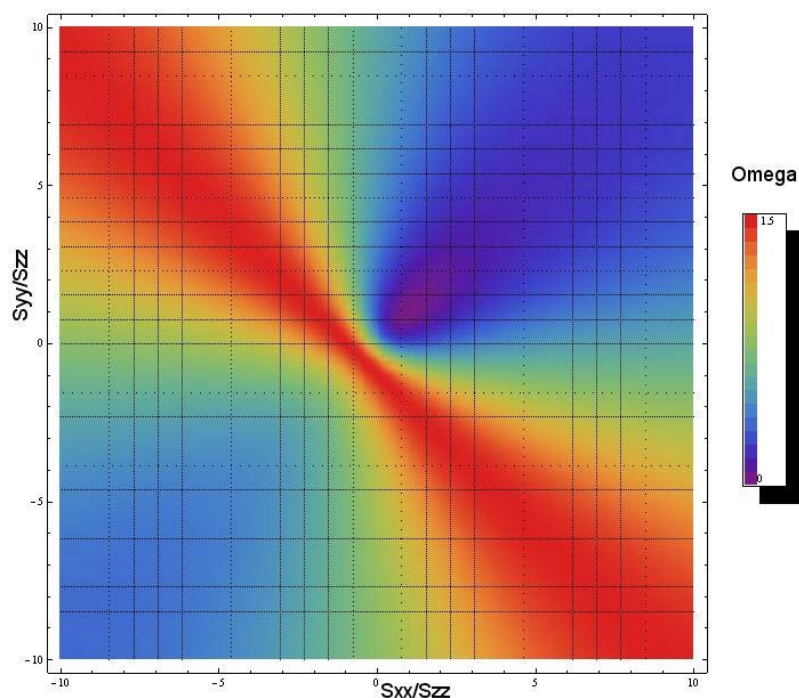


Abbildung 2-10 Falschfarbenbild von  $\Omega$  für verschiedene Verhältnisse der drei Diagonalelemente  $S_{xx}$ ,  $S_{yy}$  und  $S_{zz}$ , Maximum von  $\Omega$  ist 1.5, Minimum von  $\Omega$  ist 0.

### 2.5.1 Anisotropie der Zweiphotonen angeregten Fluoreszenz

McClain erweiterte seine Theorie der Zweiphotonenabsorption auf allgemeine Wechselwirkungen von drei Photonen mit Molekülen in Lösung [4,80]. Hierzu zählen unter anderem auch Zweiphotonen angeregte Fluoreszenz und Hyper-Raman-Streuung. Die mathematische Vorgehensweise ist analog zur Ermittlung des polarisationsabhängigen Zweiphotonenquerschnitts bei zufällig orientierten Molekülen in Lösung. Um die Intensität der Fluoreszenz  $\langle I \rangle$  bei einer bestimmten Polarisation  $\gamma$  der Emission nach der Absorption zweier Photonen der Polarisation  $\mu$  und  $\lambda$  zu bestimmen, muss wiederum über alle Orientierungen der Moleküle gemittelt werden;  $\vec{\vartheta}$  ist hier das Übergangsdipolmoment der Emission:

$$\langle I \rangle \propto \langle |\mu \cdot S^{fi} \cdot \lambda|^2 |\gamma \cdot \vec{\vartheta}|^2 \rangle \quad (2.39)$$

Wie oben beschrieben ist eine mathematische Methode der Mittelung die Kosinuistransformation zwischen Molekülkoordinaten und Laborkoordinaten [73,80]. Ergebnis dieser Mittelung ist, dass eine gemessene Fluoreszenzintensität  $I$  bei bestimmter Polarisation des Fluoreszenzphotons, die durch eine Zweiphotonenanregung mit unterschiedlichen Photonen beliebiger Polarisation induziert wurde, mit Hilfe von sieben molekularen Parametern  $Q_k$  beschrieben werden kann:

$$I = \sum_{j,k=1}^7 \hat{P}_j \hat{M}_{jk} \hat{Q}_k \quad (2.40)$$

Die Variablen  $\hat{P}_j$  sind durch die Geometrie des Experiments bestimmt, sie sind Kombinationen der Polarisationen von Anregung und Emissionsphotonen, d.h. von insgesamt bis zu drei verschiedenen Polarisationen. Die  $Q_k$  ergeben sich durch Kombinationen des Tensors mit dem Emissionsdipolmoment. Eine komplette Auflistung ist bei McClain zu finden.  $\hat{M}_{jk}$  ist eine Matrix, die die molekularen und geometrischen Parameter verbindet McClain [4,80]. Obige Gleichung ist gültig, wenn man voraussetzt, dass die Energie keines der Photonen resonant mit einem realen angeregten Zustand ist, d.h. die Anregung verläuft über einen virtuellen Übergangszustand. Zweitens wird vorausgesetzt, dass zwischen Anregung und Emission keine Rotation der Moleküle stattfindet.

Ziel eines sogenannten „Kompletten Polarisationsexperimentes“ (McClain) ist es, die  $Q_k$  zu bestimmen und daraus Rückschlüsse auf die Größe der Tensorelemente zu ziehen. Durch Messen der Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Polarisationen erhält man die  $Q_k$  und daraus sowohl Information über die Symmetrie des angeregten Zustands, als auch Angaben über

die Orientierung des Fluoreszenzdipolmoments zu den Achsen des Tensors. Die oben erwähnten  $\delta$ -Parameter sind proportional zu jeweils einem  $Q_k$ -Parameter. McClain gab einige konkrete Beispiele für experimentelle Geometrien, nähere detaillierte Aussagen wurden jedoch nicht gemacht und Verbindungen zur Anisotropie wurden nicht gezogen.

Eine erste Anwendung fand McClains Theorie in den Anisotropieexperimenten von Scott [7], die durch Zweiphotonenanregung (identische Photonen) induzierte Fluoreszenzanisotropie von Benzol bei verschiedenen Wellenlängen maßen. Anhand der gemessenen Anisotropien konnten sie die Symmetrien der angeregten Zustände genau zuordnen, was durch reine Absorptionsmessungen mit identischen Photonen nicht möglich ist. Für identische Photonen sind nur vier verschiedene  $Q_k$  messbar. Für manche Übergänge von Molekülen bestimmter Symmetrie ist dies ausreichend, um den Tensor zu charakterisieren und die Symmetrie zuzuordnen. Beispiele sind hier diagonale Tensoren oder symmetrische Tensoren, bei denen nur wenige Tensorelemente ungleich Null sind.

Es ist hilfreich, deutlich zu machen, welche Verbindungen zwischen den molekularen Parametern  $Q_k$ ,  $\Omega$  und der Anisotropie  $r$  besteht. Die Anisotropie lässt sich mathematisch einfach als Summe von Exponentialfunktionen darstellen und aus experimentellen Daten schnell berechnen. In Verbindung  $\Omega$  lässt sich so ein erster Überblick über die Art des Tensors gewinnen. Callis verknüpfte McClains Theorie und Parameter mit experimentellen Messungen von Zweiphotonenanisotropien - vor allem von Indol und Indolderivaten - und zeigte, welche Rückschlüsse man über die Form eines Tensors ziehen kann [35,65,79]. Er führte den Begriff der „Tensorform“ (shape of a tensor) ein, bei der die Amplitude der Anregung  $A_2$  mit zwei identischen Photonen in einem Koordinatensystem gegen den Winkel des eingestrahnten linear polarisierten Lichts aufgetragen wird. Für unterschiedliche Verhältnisse der Tensorelemente  $S_{aa}^{fi}$  (Diagonaltensor) berechnete Callis  $\Omega$  und die maximale/minimale Anisotropie  $r$ , die mit linear polarisierten Photonen gemessen werden kann.  $A_2$  ist folgendermaßen definiert:

$$A_2 = \lambda \cdot S^{fi} \cdot \lambda \quad (2.41)$$

Callis beschränkte sich dabei jedoch nur auf Fälle, bei denen mit zwei identischen Photonen angeregt wird. In Abbildung 2-11 sind vier Beispiele für Tensorformen gezeigt. Es handelt sich dabei um eine Kugelkoordinaten-Darstellung von Gleichung 2.41. Für die (lineare) Anisotropie  $r$  ist der maximal erreichbare Wert angegeben.

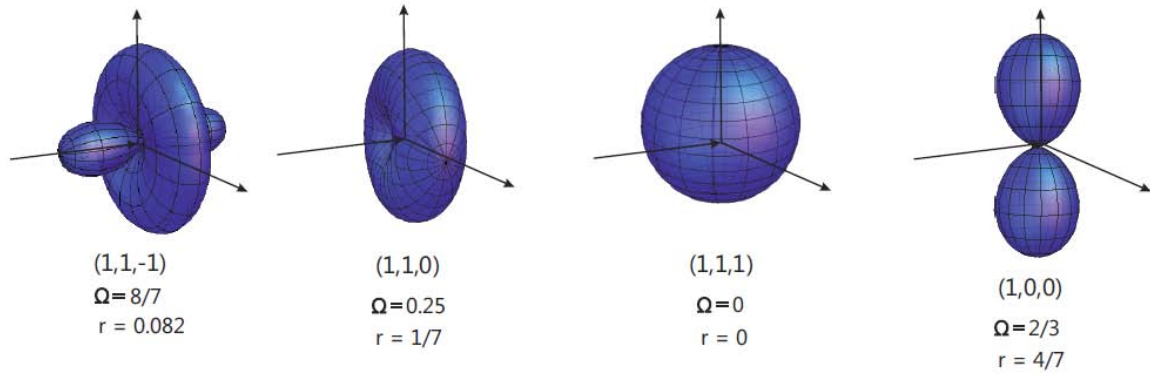


Abbildung 2-11 Beispiele für Tensorformen bei verschiedenen Verhältnisse der diagonalen Tensorelemente, Auftragung der Amplitude der Absorption für lineare polarisierte Photonen in sphärischen Koordinaten; die Anisotropien sind die maximal Erreichbaren beim jeweiligen Tensor (s. auch Callis in [35].

Im Gegensatz zur Einphotonenanisotropie, bei der die Größe der Anisotropie im Prinzip nur durch den Winkel zwischen Emissions- und Absorptionsdipolmoment gegeben ist, ist eine Zweiphotonenanisotropie vom Winkel des Emissionsdipolmoments **und** der Form des Tensors abhängig.

Wan und Johnson wiesen daraufhin, dass nur durch das Messen von  $\Omega$  und einer Anisotropie bei Anregung mit linear polarisierten Photonen, keine präzisen Aussagen über das Verhältnis der Tensorelemente möglich sind. Sie führten zusätzlich zur allgemein bekannten linearen Anisotropie drei weitere Anisotropien ein, die man durch die Anregung mit verschiedenen polarisierten Photonen erhält. Zwei dieser Anisotropien (linear parallel, zirkular gleichsinnig) lassen sich einfach mit einem herkömmlichen Zweiphotonenaufbau messen. Diese wurden explizit für verschiedene Tensoren errechnet [74].

Bei 2C2P-Anregung lassen sich weitere Anisotropien messen. Hier sollen vier Anisotropien definiert werden. In Abbildung 2-12 sind die parallele Anisotropie ( $r\text{-par}$ ), die zirkulare Anisotropie (gleichsinnig,  $r\text{-circ co}$ ), die Anisotropie bei zirkular gegensinniger Anregung ( $r\text{-circ con}$ ) und die Anisotropie für senkrecht zueinander polarisierte Photonen ( $r\text{-per}$ ) für zweidimensionale Tensoren dargestellt. Das Emissionsdipolmoment ist parallel zu  $S_{zz}$ . Es sei angemerkt, dass die hier berechneten Anisotropien für zirkulare Anregung ( $r\text{-circ co}$ ) sich von den von Wan berechneten im Vorzeichen unterscheiden. Dies ist auf unterschiedliche Definitionen von parallelem und senkrechtem Kanal zurückzuführen. Anzumerken ist, dass sich für zweidimensionale Tensoren  $r\text{-per}$  und  $r\text{-circ.co}$  nur im Vorzeichen unterscheiden. Nur bei einem Tensor mit einem einzigen Element haben die Anisotropien ein festes Zahlenverhältnis. Diese Werte sind in der Abbildung mit Pfeilen markiert.

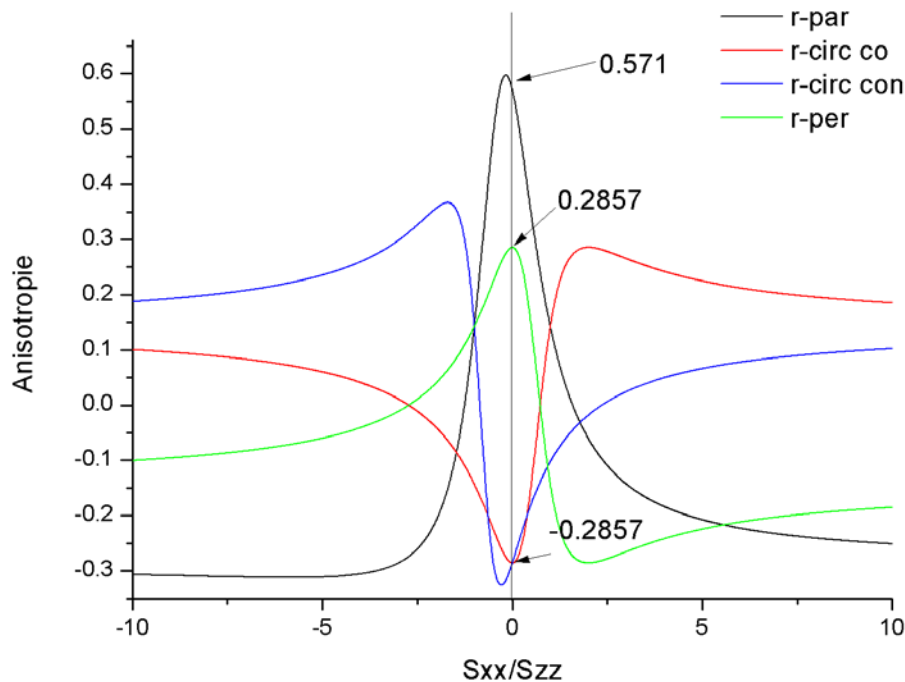


Abbildung 2-12 Anisotropie-Werte für verschiedene Verhältnisse von  $S_{xx}/S_{zz}$ , das Fluoreszenzdipolmoment ist parallel zur z-Tensor-Achse, r-par (parallel polarisierte Photonen), r circ co (zirkular gleichsinnige Photonen), r circ con circular (zirkular gegensinnig polarisiert), c senkrecht polarisierte Photonen.

McClains Betrachtungen gelten für Messungen bei denen zwischen Absorption und Emission keine Rotation der Moleküle stattfindet, eine Zeitabhängigkeit der Parameter muss daher nicht berücksichtigt werden. Die zeitabhängige Rotationsdiffusion im kartesischen Formalismus wurde später von Chen und van der Meer beschrieben [81].

Die zweite Methode der Mittelung über alle Orientierungen der Moleküle ist die Umformung des kartesischen Zweiphotonentensors und Fluoreszenzdipolmoments in sphärische Tensoren [74,75]. Das Resultat der Berechnungen ist das gleiche wie bei McClain. Im Normalfall (nicht resonanter Übergangszustand, s.o.) werden auch hier sieben molekulare Parameter für 2C2P-angeregte Fluoreszenz erhalten. Im Unterschied zu den  $Q_k$ -Parametern von McClain lassen sich jedoch diese Parameter streng in isotrope und anisotrope Parameter einteilen. Dadurch wird die Beschreibung der zeitabhängigen Diffusion einfacher.

In dieser Arbeit wurde der sphärische Tensorformalismus nach Vasyutinskii genutzt [78]. Der Formalismus unterscheidet sich bis auf wenige Faktoren nicht wesentlich von dem durch Wan und Johnson definierten. Die Bezeichnung der molekularen Parameter ( $M_{Ke}(R, R')$ -Parameter, kurz M-Parameter) erfolgt auf Basis der sphärischen Tensoren. Die Berechnung der sphärischen Tensoren und ihre Beziehung zu kartesischen Tensorkomponenten sind im Appendix und bei Shternin *et al.* [78] zu finden. Die erhaltenen Parameter jeder Art der Be-

rechnung (McClain/Wan/Vasyutinskii) sind in einander überführbar, alle in diesem Abschnitt gezeigten Graphen wurden mit Hilfe der M-Parameter berechnet. Die erhaltenen Werte entsprechen exakt denen aus der Literatur.

Auf mathematische Details soll hier nicht eingegangen werden, vielmehr soll eine Art Leitfaden zur Interpretation von gemessenen M-Parametern gegeben werden. In Tabelle 2-5 alle sieben molekularen Parameter und einige ihrer Eigenschaften aufgeführt. Sie lassen sich grundsätzlich in Parameter nullter Ordnung (isotrop) und Parameter zweiter Ordnung (anisotrop) einteilen:

Tabelle 2-5 Molekulare  $M_{K\epsilon}(\mathbf{R}, \mathbf{R}')$ -Parameter nach [78].

M-Parameter ( $M_{K\epsilon}(\mathbf{R}, \mathbf{R}')$ )	Wertebereiche	Eigenschaften
$M_0(0,0)$	positiv	<b>Isotrop</b> Indikator für totale Symmetrie, 0 für nicht totale Symmetrie, proportional zur Summe aller Diagonalelemente
$M_0(2,2)$	positiv	<b>Isotrop</b> , alle Tensorelemente spielen eine Rolle
$M_0(1,1)$	positiv	<b>Isotrop</b> , Nicht-Symmetrie-Indikator, 0 für symmetrische Tensoren, 0 für Messungen mit Photonen gleicher Wellenlänge
$M_2(2,2)$	Positiv/negativ	<b>Anisotrop</b> , keine einfachen Angaben möglich, alle kartesischen Tensorelemente bestimmen den Wert
$M_2(0,2)$	Positiv/negativ	<b>Anisotrop</b> , 0 für nicht totalsymmetrische Übergänge
$M_2(1,1)$	Positiv/negativ	<b>Anisotrop</b> , 0 für Messungen mit identischen Photonen/symmetrische Tensoren
$M_2(1,2)$	Positiv/negativ	<b>Anisotrop</b> , 0 für Messungen mit identischen Photonen/ symmetrische Tensoren

Die wichtigsten Beziehungen zwischen den  $\delta_i$ -Parametern, anderen oben definierten Größen und den M-Parametern sind in den nun folgenden Gleichungen aufgeführt. Die Beziehung zwischen den  $\delta_i$  (McClain) und den M-Parametern ist:

$$\delta_F = 3M_0(0,0) \quad (2.42)$$

$$\delta_G = M_0(0,0) + \sqrt{5}M_0(2,2) + \sqrt{3}M_0(1,1)$$

$$\delta_H = M_0(0,0) + \sqrt{5}M_0(2,2) - \sqrt{3}M_0(1,1)$$

Der wichtige Parameter  $\Omega$  berechnet sich mit  $M_0(0,0)$  und  $M_0(2,2)$  wie folgt:

$$\Omega = \frac{I_{circ\ co}}{I_{lin\ par}} = \left( \frac{3M_0(2,2)}{\sqrt{5}M_0(0,0) + 2M_0(2,2)} \right) \quad (2.43)$$

Die totale Fluoreszenzintensität in M-Parametern für die einfachsten Kombinationen von Polarisation der Anregungsphotonen (linear parallel/senkrecht ( $I_{lin\ par/per}$ ), zirkular gleichsinnig/gegensinnig ( $I_{circ\ co/con}$ ),:

$$I_{lin\ par} = \frac{C}{9} \cdot \left[ M_0(0,0) + \frac{2}{\sqrt{5}} M_0(2,2) \right] \quad (2.44)$$

$$I_{lin\ per} = \frac{C}{9} \cdot \left[ \frac{\sqrt{3}}{2} M_0(1,1) + \frac{3}{2\sqrt{5}} M_0(2,2) \right]$$

$$I_{circ\ co} = \frac{C}{3\sqrt{5}} M_0(2,2)$$

$$I_{circ\ con} = \frac{C}{9} \cdot \left[ M_0(0,0) + \frac{\sqrt{3}}{2} M_0(1,1) + \frac{1}{2\sqrt{5}} M_0(2,2) \right]$$

$C$  ist ein Faktor, der von u.a. Anregungsintensität, der Quantenausbeute, der Detektionseffizienz abhängig ist. Die totalen Intensitäten sind nicht komplett voneinander unabhängig, es gilt daher:

$$I_{lin\ par} + I_{lin\ per} = I_{circ\ co} + I_{circ\ con} \quad (2.45)$$

Für einen Tensor, der von einem Element dominiert wird, sind die totalen Intensitäten (normiert):  $I_{lin\ par} = 1$ ,  $I_{lin\ per} = 0.33$ ,  $I_{circ\ co} = 0.66$ ,  $I_{circ\ con} = 0.66$

Nach der obigen Definition einiger wichtiger Beziehungen sollen nun für einige Tensoren bzw. Verhältnisse der Tensorelemente die  $M_{K_e}(R, R')$  errechnet werden, um einen Bezug zur Literatur und den gemessenen Ergebnissen in Abschnitt 5.4.2 zu schaffen. Viele Moleküle im UV-Bereich sind den Punktgruppen  $C_{2v}$ ,  $C_{2h}$ ,  $D_{2h}$ , oder  $D_2$  zuzuordnen. McClain zufolge haben Tensoren für Übergänge von A oder B-Symmetrie dieser Punktgruppen folgende Tensorformen:

$$A \leftarrow A = \begin{bmatrix} s_1 & s_4 & 0 \\ s_5 & s_2 & 0 \\ 0 & 0 & s_3 \end{bmatrix} \quad B_g \leftarrow A_g = \begin{bmatrix} 0 & s_6 & 0 \\ s_7 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (2.46)$$

Die Berechnung der M-Parameter vereinfacht sich dadurch, dass einige Tensorelemente Null sind. Um eine Vorstellung von der Größe der molekularen Parameter zu geben, sind in untenstehender Tabelle berechnete M-Parameter,  $\Omega$  und zu erwartende Anisotropien für einige Verhältnisse der Tensorelemente obiger Tensorformen aufgeführt. Hierbei wurden einige vereinfachende Annahmen gemacht. (s. auch Abschnitt 8.2 für die Berechnung):

Tabelle 2-6 Errechnete Werte für M-Parameter bei verschiedenen vereinfachten Tensoren.

M-Parameter normiert auf $M_0(2,2)$ $\Omega$ /Anisotropien	Zweiphotonentensor $S^{\text{ff}}$ (xx,yy,zz, xy, yx), Fluoreszenzdipolmoment $\nu$ (x,y,z) in Molekülkoordinaten				
	(1,0,0,0,0) (1,0,0)	(1,1,1,0,0) (1,0,0)	(0.5,0,0,0,1,0) (1,0,0)	(1,0.5,0.2,0,0,0) (0,1,0)	(0,0,0,1,1,1) (1,0,0)
$M_0(0,0)$	1.118	Nicht definiert, da $M_0(2,2)=0$	0.279	6.594	0
$M_0(2,2)$	1	0	1	1	1
$M_0(1,1)$	0	0	0.106	0	0
$M_2(2,2)$	1.690	0	1.056	-1.621	0.845
$M_2(0,2)$	2.236	0	0	-0.776	0
$M_2(1,1)$	0	0	-0.1065	0	0
$M_2(1,2)$	0	0	-0.207	0	0
$\Omega$	0.666	0	1.14	0.179	1.5
r lin par	0.571	0	0.326	-0.074	0.143
r circ co	-0.286	0	-0.17	0.274	-0.143
r circ con	-0.286	0	-0.089	0.0138	0.143
r-lin per	0.286	0	0.181	0.274	0.143

Aus Tabelle 2-6 lässt sich wie oben ausgeführt entnehmen, dass nur für asymmetrische Tensoren die Parameter  $M_0(1,1)$ ,  $M_2(1,1)$ ,  $M_2(1,2)$  im Vergleich zu den anderen Parametern messbare Werte annehmen. Diese Parameter sind zusätzlich wellenlängenabhängig. Je größer



die Unterschiede in den Wellenlängen der Photonen sind, desto größere Werte können sie einnehmen. Dieses Ergebnis ist wie erwartet analog zu den Ergebnissen von McClain und Wan/Johnson.

Für Übergänge, die entartet sind ( $E_{1g}$ ,  $E_{2g}$  bei Benzol) und bei Moleküle höherer Symmetrie müssen die Tensorelemente  $zx$ ,  $xz$ ,  $yz$ ,  $zy$  nicht mehr zwangsläufig null sein. Die obige Tabelle kann daher nur Auswahl der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der Tensorelemente und M-Parameter repräsentieren.

In Tabelle 2-7 ist zusammenfassend aufgeführt, wie viele molekulare Parameter (d.h. Information über Symmetrien usw.) mit welcher Art der Anregung (OPE, TPE, 2C2P) durch Fluoreszenzmessungen von Molekülen in Lösung gemessen werden können. Für OPE lassen sich nur der Absorptionsquerschnitt und die Anisotropie messen. Für TPE sind es vier molekulare Parameter, d.h. es können sowohl Informationen über Übergänge, die durch symmetrische Tensoren beschrieben werden als auch die relative Ausrichtung des Fluoreszenzdipolmomentes erhalten werden. Nur mit 2C2P erhält man die maximal extrahierbare Information für elektronische Übergänge von Molekülen in Lösung.

In Abschnitt 4.9.2 wird gezeigt, wie die hier vorgestellten theoretischen Ergebnisse genutzt werden können, um mit Hilfe von experimentellen Daten die M-Parameter zu bestimmen.

**Tabelle 2-7 Zusammenfassung über messbare Parameter bei OPE, TPE und 2C2P.**

	<b>OPE</b>	<b>TPE (identische Photonen)</b>	<b>2C2P (unterschiedliche Photonen)</b>
<b>Molekularer Übergangs-Tensor</b>	Übergangsdipolmoment	Zweiphotonentensor $S_{ij}$ (3x3-Matrix)	Zweiphotonentensor $S_{ij}$ (3x3-Matrix)
<b>Auswahlregeln</b>	$g \rightarrow u$ $- \rightarrow +$	$g \rightarrow g$ $- \rightarrow -$	$g \rightarrow g$ , $- \rightarrow -$ einige Übergänge nur mit 2 Farben anregbar
<b>Absorptionsrate in Lösungen</b>	polarisations-unabhängig	polarisationabhängig	polarisationabhängig
<b>Molekulare Parameter</b>	2	4	7

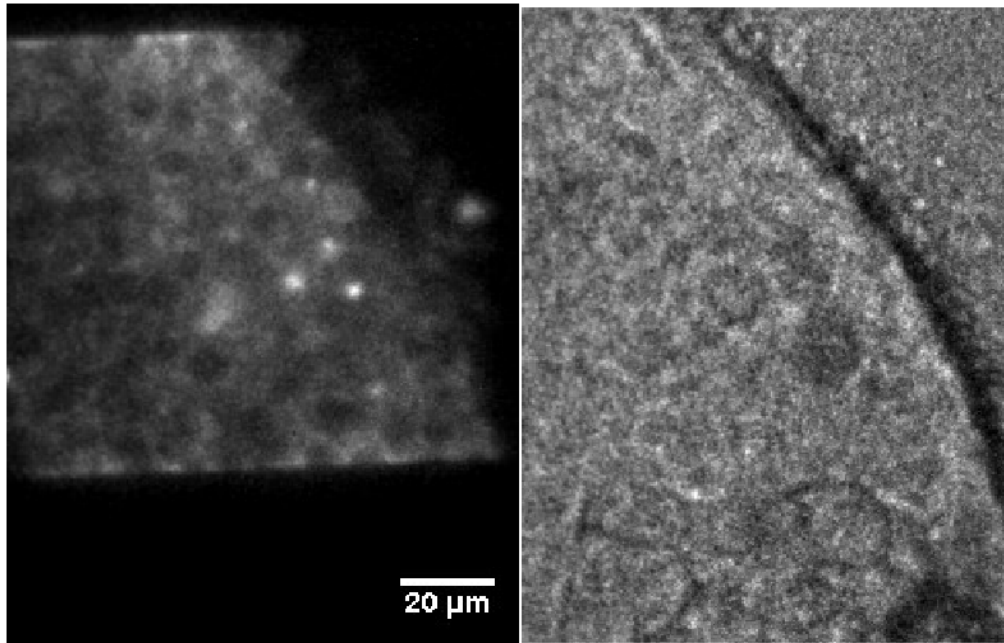


### 3 NAD(P)H und Calcium in $\beta$ -Zellen

Das vorherige Kapitel zeigt die theoretischen Grundlagen für Zweiphotonenmikroskopie und Fluoreszenzmessungen. In diesem Kapitel soll auf die biologische Anwendung näher eingegangen werden, konkret auf die Zweiphotonenmikroskopie von  $\beta$ -Zellen des Pankreas in Kombination mit Fluoreszenzlebensdauer-messungen. Zunächst werden einige Grundlagen des Metabolismus dieser Zellen beschrieben.

Das Pankreas (die Bauchspeicheldrüse) ist ein Organ, das Verdauungsenzyme in den Darm abgibt und den Blutzuckerspiegel durch Abgabe von Insulin direkt in den Blutkreislauf regelt. Nur ein Teil der Pankreaszellen ist für diese Regulation verantwortlich. Nur in den Langerhans'schen Inseln wird Insulin produziert. Ihr Anteil an der Gesamtzahl der Pankreaszellen beträgt nur wenige Prozent.

Eine Langerhans'sche Insel ist aus drei Zelltypen aufgebaut: Den Hauptanteil bilden die Insulin ausschüttenden  $\beta$ -Zellen mit ca. 70 %, die das Hormon Somatostatin produzierenden  $\delta$ -Zellen haben einen Anteil von 10 %. Den restlichen Teil nehmen die sogenannten  $\alpha$ -Zellen ein, die sich hauptsächlich in der Peripherie der Inseln befinden und vornehmlich Glukagon ausschütten. Pankreasinseln können Durchmesser bis zu 500  $\mu\text{m}$  erreichen; die in dieser Arbeit verwendeten Inseln waren jedoch deutlich kleiner (ca. 150  $\mu\text{m}$ ). In Abbildung 3-1 sind zwei Bilder eines Teilausschnittes einer Insel zu sehen. Das linke Bild zeigt die Autofluoreszenz einer Insel. Hier sind deutlich die einzelnen Zellen zu erkennen, die runden Objekte innerhalb der Zellen mit wenig Intensität sind Zellkerne. Das rechte Bild zeigt das Durchlichtbild des gleichen Ausschnittes, dabei ist nur wenig Struktur zu sehen.



**Abbildung 3-1** Zweiphotonen angeregte Autofluoreszenz eines Teilausschnitts einer Insel (NMRI-Maus), rechtes Bild: Durchlichtbild der gleichen Insel.

Ein erhöhter Blutzuckerspiegel stimuliert bei gesunden Lebewesen die Ausschüttung von Insulin aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Es werden zwei Signalwege unterschieden, die zur Ausschüttung führen: Der sogenannte „triggering pathway“ wurde genauestens untersucht und stellt den Hauptweg dar: Glucose wird in die  $\beta$ -Zellen transportiert und dort im Stoffwechsel umgesetzt. In der Glykolyse (Zytosol) und im Zitratzyklus (Mitochondrien) wird beim Abbau der Glucose  $\text{NAD}^+$  (Nicotinadenindinucleotid) zu  $\text{NADH}$  (reduziertes Nicotinadenindinucleotid) reduziert. In der Atmungskette dient  $\text{NADH}$  anschließend als Reduktionsmittel und Elektronenlieferant. Dort wird  $\text{ADP}$  zu  $\text{ATP}$  phosphoryliert [82]. Steigt das Verhältnis von  $\text{ATP}$  zu  $\text{ADP}$  über ein bestimmtes Niveau, führt das zum Schließen der  $\text{ATP}$ -abhängigen Kaliumkanäle in den Zellen. Kaliumionen können nicht mehr ausströmen. Es kommt zu einer Depolarisation der Zellmembran und rhythmischem Schließen und Öffnen spannungsabhängiger Calcium-Kanäle. Calciumionen strömen in die Zelle ein, wodurch sich die intrazelluläre Calciumkonzentration (oszillatorisch) erhöht. Eine Steigerung der Insulin-Sekretion ist die Folge.

Ein Calcium-Signal, dass durch eine Depolarisation der Zellmembran ausgelöst wurde, bewirkt jedoch nur eine sogenannte monophasische Sekretionssteigerung. Eine deutliche stärkere sogenannte biphasische Steigerung bedarf der zusätzlichen Aktivierung durch den „amplifying pathway“ [14]. Dieser Signalweg ist weniger gut untersucht, in Frage kommen hier  $\text{NADH}$  und  $\text{NADPH}$  und/oder  $\text{ATP}$ .

*Autofluoreszenz von  $\beta$ -Zellen des Pankreas*

Seit den 60er Jahren wird das Messen der Autofluoreszenz von Zellen und Organen dazu benutzt, Einblicke in die zellulären Signalwege und den sogenannten Redox-Status einer Zelle zu erhalten [83]. Als Redox-Status wird meist das Konzentrationsverhältnis von  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  definiert.  $\text{NAD}^+$  ist in einem deutlich größeren Umfang als  $\text{NADH}$  in einer Zelle enthalten (mit Unterschieden im Cytosol und den Mitochondrien), damit das Redoxpotential aufrechterhalten wird [84]. Während die oxidierte Form ( $\text{NAD}^+$ ) ein sehr kleine Quantenausbeute (ca. 0.0005) aufweist, hat die reduzierte Form eine deutlich höhere Quantenausbeute von 0.019 [33]. Bei metabolischen Änderungen in den Zellen/Organen durch äußere Einflüsse wie z.B. die Sauerstoffzufuhr zu den Zellen oder Stimulation durch pharmakologische Substanzen steigt oder sinkt die Autofluoreszenz. Bei Mangel an Sauerstoff (Hypoxie) in den Zellen steigt die Fluoreszenzintensität an, da in der Atmungskette weniger  $\text{NADH}$  oxidiert wird und es zur Akkumulation in den Mitochondrien kommt. Ähnliche Effekte sind auch durch Stoffe, die direkt mit den Enzymen der Zellatmung wechselwirken bekannt [85,86].

Es gibt eine ganze Reihe endogener Fluorophore, die ebenfalls noch zur Autofluoreszenz einer Zelle beitragen können. Dazu gehören bestimmte Aminosäuren (Dreiphotonen-Fluoreszenz), in Haut z.B. Elastin, Kollagen und Keratin. In allen anderen Zellen ist der Beitrag von  $\text{NADH}$  und  $\text{FAD}$  (Flavin-Adenin-Dinukleotid) am größten. Da  $\text{NADH}$  und  $\text{FAD}$  eine wichtige Rolle im Zellmetabolismus spielen, sind also Änderungen in der Autofluoreszenz direkt auf Änderungen im Stoffwechsel zurückzuführen, dieser kann also nicht invasiv beobachtet werden.

Die beiden Fluorophore ( $\text{NADH}/\text{FAD}$ ) können auf spektralem Wege (Anregungswellenlänge/Emissionsfilter) getrennt werden; meistens wird nur die Änderung der Fluoreszenzintensität von  $\text{NADH}$  beobachtet. Neben  $\text{NADH}$  gibt es auch noch  $\text{NADPH}$  im Metabolismus, beide haben gleiche Spektren und nahezu identische Lebensdauern. Sie lassen sich nur durch indirekte Methoden unterscheiden [87]. Da  $\text{NADPH}$  jedoch nur einen geringen Konzentrationsanteil in einer Zelle hat, ist es zu vernachlässigen.

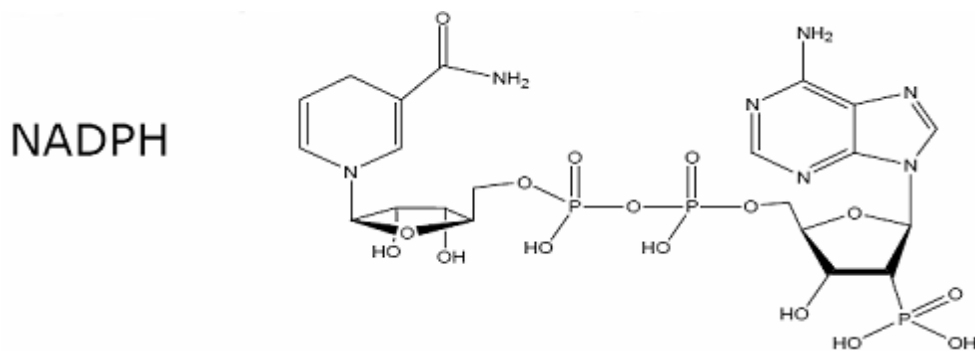
Mit einer Multiphotonenanregung lassen sich alle genannten Fluorophore beobachten. Die Anregung durch drei Photonen kann weitestgehend vernachlässigt werden, da die Absorptionsquerschnitte um Größenordnungen niedriger sind (s. Abschnitt 2.3)

Schon in den siebziger Jahren wurde von Panten und anderen [88] der Mechanismus der Insulin-Sekretion von isolierten Inseln aus dem Pankreas durch Autofluoreszenzmessungen näher untersucht. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen der Intensität der Autofluoreszenz bei der Gabe von verschiedenen Kohlenhydraten und der Sekretion von Insulin fest. Die Stärke der Änderung der Intensität hängt von den Kohlenhydraten ab; sie werden auf unterschiedlichen Wegen in der Zelle angebaut. Die Erhöhung der Autofluoreszenz bei Gabe von Glucose ist ein komplexer Mechanismus, sie hängt von der Konzentration der Glucose ab und wird auch durch die Calciumkonzentration gesteuert [89].

Eine der ersten Zweiphotonenmessungen in Pankreas-Inseln wurde Mitte der Neunziger von Bennett und Piston [90,91] durchgeführt; sie visualisierten die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität bei Gabe von Glucose.

#### *Photophysik von NAD(P)H*

Die Erhöhung der Autofluoreszenzintensität kann mehrere Gründe haben. Zum einen verstärkte Bildung von NAD(P)H durch den Abbau von Glucose in Glykolyse/Zitronensäurezyklus; also im Mittel eine generelle Konzentrationserhöhung. Zum anderen kann es aber auch zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch eine Veränderung der Quantenausbeute kommen, wie es bei der Bindung von NAD(P)H an Proteine geschieht. Diese Veränderung der Quantenausbeute kann durch zeitaufgelöste Messungen (Fluoreszenzlebensdauermessungen) sichtbar gemacht werden.



**Abbildung 3-2 Molekülstruktur von NADPH.**

Die Quantenausbeuteänderung lässt sich anhand der Struktur von NADPH erklären, die in Abbildung 3-2 zu sehen. Wie viele biologisch relevante Moleküle ist NADH aus Nukleotiden, Ribosen und Phosphatgruppen aufgebaut. Ein Adenin und ein Nicotinamid sind jeweils an eine Ribose gebunden. Beide sind über Phosphatgruppen miteinander verknüpft. In Abbildung 3-3 ist das Absorptions und Emissionsspektrum von NADH in PBS dargestellt. Im Ab-

sorptionsspektrum lassen sich die Banden den Teilstrukturen von NADH zuordnen. Im tiefen UV ( $< 230$  nm) absorbiert das Grundgerüst des Moleküls; die zweite Bande bei 260 nm stimmt mit dem Absorptionsmaximum vom Adenin überein. Die dritte Bande lässt sich der Nicotinamidgruppe zuordnen. Es ist jedoch nur bei NAD(P)H, nicht bei  $\text{NAD}^+$  zu finden. Die reduzierte Nicotinamidgruppe ist das Chromophor beim NAD(P)H, die Fluoreszenz ist daher bei der nicht reduzierten Form NAD nur sehr gering. Keine charakteristischen Vibrationsbanden sind im Emissionsspektrum erkennbar, das Maximum liegt bei 460 nm.

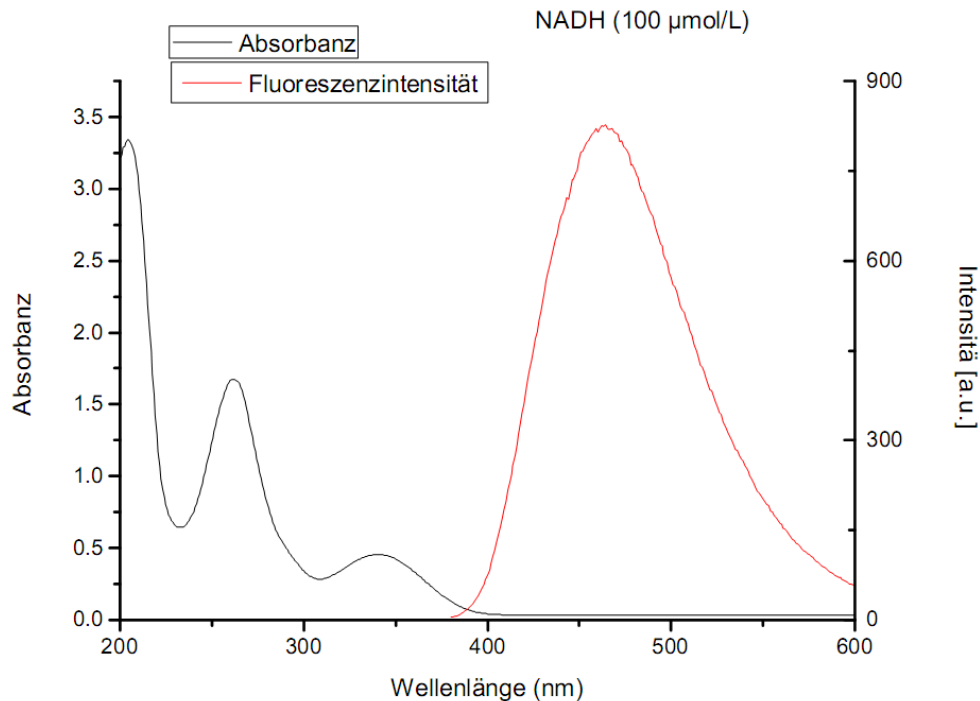


Abbildung 3-3 UV/VIS Absorptionsspektrum von 100 µmol/L NADH in PBS und unkorrigiertes Emissionsspektrum von 100 µmol/L NADH in PBS.

NAD(P)H liegt in wässriger Lösung in verschiedenen Konformationen vor, von denen sich drei mit hoch zeitaufgelösten Lebensdauermessungen identifizieren lassen [92]. Je nach Konformation ist die Wechselwirkung zwischen der Adeningruppe und der Nicotinamidgruppe unterschiedlich stark ausgeprägt (intramolekulares Quenching), was unterschiedliche Lebensdauern zur Folge hat: Eine gefaltete Form hat eine Lebensdauer von ca. 200 ps, eine gestaffelte indessen ca. 700 ps. Im Mittel ergibt sich also für NAD(P)H (sogenanntes freies NAD(P)H) eine Lebensdauer von ca. 400 ps. Die dritte Form (Lebensdauer  $> 700$  ps) hat nur einen Anteil von 1 % und wirkt sich daher nicht stark auf den Mittelwert aus.

Bei zeitaufgelösten Messungen in Zellen ist es meist nicht möglich, alle oben erwähnten Formen genau voneinander zu trennen, da NAD(P)H (und auch FAD) dort zusätzlich an Enzyme/Proteine binden. Dabei ändert sich erneut die Konformation, und das intramolekulare

Quenching wird verstärkt (FAD) oder weiter reduziert (NAD(P)H). Infolgedessen ändert sich die gemessene Lebensdauer deutlich im Vergleich zur wässrigen Lösung [15,93]. Außerdem gibt es eine kleine Blauverschiebung des Emissionsspektrums. Je nach Konzentrationsverhältnis von NAD(P)H und Protein liegen die freie und die gebundenen Form in entsprechenden Anteilen vor. Ein an ein Protein gebundenes NAD(P)H-Molekül hat eine gestreckte Konformation (d.h. geringe Wechselwirkung zwischen Adenin und Nikotinamid), die Lebensdauer variiert je nach Protein zwischen 1.2 bis 10 ns [60]. In Zellen ist NAD(P)H an eine Vielzahl von Proteinen gebunden, so dass zeitaufgelöste Fluoreszenzlebensdauermessungen nur eine Verteilung der verschiedenen Bindungen an Proteine (Lebensdauern) wiedergeben können.

In Zellen kann demzufolge nicht invasiv durch Lebensdauermessungen zwischen den Anteilen an freiem NADH (inaktiv, nicht direkt in eine Reaktion involviert) und Protein gebundenem (aktiv) unterschieden werden, was durch andere Methoden (Intensitätsmessungen) nicht möglich ist.

Eine gemessene Fluoreszenzabklingkurve von NADP(H) in Zellen muss mathematisch mindestens durch eine biexponentielle Funktion beschrieben werden:

$$F(t) = a_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{f1}}\right) + a_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{f2}}\right) \quad (3.1)$$

Bei gleichem Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt geben die Vorfaktoren  $a_1$  und  $a_2$  jeweils die relativen Konzentrationen der freien ( $a_1$ ) und gebundenen ( $a_2$ ) Form von NADH wieder. In dieser Arbeit wird in den Graphiken meistens der normierte Wert ( $a_2/(a_1+a_2)$ ) von  $a_2$  angegeben (ratio, in Prozent). Aufgrund der geringen Lebensdauerdauer ist der Beitrag der freien Form zur integralen Fluoreszenzintensität - welche bei nicht zeitaufgelösten Experimenten gemessen wird - relativ gering. Die integrale Fluoreszenzintensität  $F$  ist:

$$F = a_1 \cdot \tau_{f1} + a_2 \cdot \tau_{f2} \quad (3.2)$$

Manchmal wird statt der Vorfaktoren auch der fraktionelle Anteil an der Gesamtfluoreszenz angegeben:

$$f_1 = (a_1 \cdot \tau_{f1}) / (a_1 \cdot \tau_{f1} + a_2 \cdot \tau_{f2}) \quad (3.3)$$

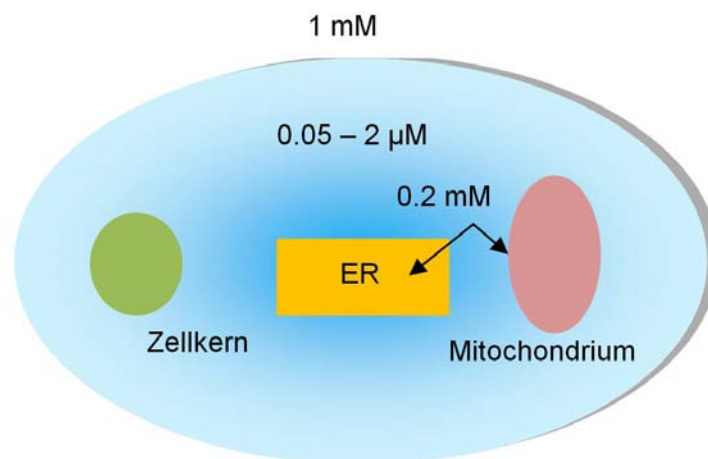
Ein Rechenbeispiel: Bei einem Konzentrationsverhältnis von 50:50 und einem Lebensdauer-verhältnis von 500 ps (frei) zu (2800 ps) gebunden, ist der Anteil der freien Form an der Gesamtintensität entsprechend gering (ca. 15 %). Dieser geringe Beitrag zur Gesamtintensität



führt daher bei Messungen von NADH-Emissionspektren in Zellen zur verfälschten Annahme, dass nahezu alles NADH gebunden ist [16]. In der Literatur wird bei biexponentiellen Messungen auch oft eine mittlere Lebensdauer angegeben, die sich über  $f_1\tau_1 + f_2\tau_2$  berechnet. Jedoch hat auch hier die lange Lebensdauer ein großes Gewicht, so dass kleine Änderungen in der Konzentration (d.h. Vorfaktoren) bei Messungen übersehen werden können. Nur über genaue Bestimmung der Vorfaktoren  $a_1$  und  $a_2$  können daher Änderungen im Konzentrationsverhältnis sichtbar gemacht werden.

#### *Die Rolle von Calcium bei der Sekretion von Insulin*

Ionen wie Natrium, Kalium und Calcium dienen innerhalb der Zelle als Signalüberträger. Sie zählen zu den so genannten „second messengers“, d.h. sie werden erst dann wichtig, nachdem ein Hormon oder ein anderer primärer Signaltransmitter an einen Rezeptor andockt ist. Diese Ionen liegen im Körper schon in bestimmter Konzentration vor, sie müssen nicht erst synthetisiert werden. Die Signalübermittlung kann daher nur über eine Erhöhung der Konzentration geschehen. Calciumionen spielen eine Rolle bei der Entwicklung von Zellen, bei Übertragung von Information in Nervenzellen und auch bei der Sekretion von Insulin, siehe oben und [89,94]. Im extrazellulären Medium liegt eine um vielfach höhere Calciumkonzentration als in den Zellen vor (ca. 1 mmol/L ausserhalb und ca. 100 nmol/L innerhalb der Zellen).



**Abbildung 3-4** Schematische Darstellung der Calciumkonzentrationen in einer Zelle.

Im Metabolismus der  $\beta$ -Zellen nimmt die Calciumkonzentration eine besondere Rolle ein. Allein durch Änderung der Calciumkonzentration, auf normalem physiologischem Weg (z.B. durch Gabe von Glucose) oder auch auf nicht physiologischen Weg (durch elektrische Stimulation oder Gabe von pharmakologischen Substanzen) lässt sich eine Steigerung der Insulinsekretion herbeiführen. Diese Änderung der Calciumkonzentration lässt sich durch Calcium

sensitive Fluorophore („Calciumindikatoren“) messen, welche bei Bindung an Calcium entweder eine Verschiebung im Absorption/Emissionsspektrum und/oder eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Änderung der Quantenausbeute) aufweisen. Durch „Anfärben“ von Zellen mit diesen Indikatoren kann somit untersucht werden, wie groß die Änderungen der Calciumkonzentration sind. Die Änderung der Quantenausbeute lässt sich für FLIM-Messungen ausnutzen, was bedeutet, dass die Calciumkonzentration in Pankreas-Zellen auch durch Lebensdauermessungen verfolgt werden kann.

## **4 MATERIALIEN UND METHODEN**

### **4.1 Biologische Proben (MIN6-Zellen, Pankreas)**

MIN6-Zellen wurden für nahezu alle Vormessungen verwendet, sie sind eine immortalisierte  $\beta$ -Zelllinie des Pankreas [95], die sich einfach kultivieren lässt. Die Leistungen hinsichtlich der Insulinsekretion und Zellantwort auf Stimuli geben jedoch nur unzureichend die Gesamtheit der Stimulus-Sekretionskopplung wieder. Die MIN6-Zellen wurden bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid in einem Inkubator in DMEM-Medium, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin (High-Glucose, 4.5 g/L, PAA) kultiviert.

Pankreasinseln wurden durch die Andauung des Bindegewebes mit dem Enzym Kollagenase aus der Bauchspeicheldrüse von NMRI-Mäusen isoliert und auf mit Kollagen beschichtete Deckgläschen aufgebracht [96]. Dort wachsen sie an und werden bis zu eine Woche in Nährmedium am Leben gehalten. Eine begrenzte Inkubation in calciumfreier Lösung führt zum Lösen der Zellkontakte in der Insel. Dabei erhält man isolierte Pankreasinseln, die wiederum auf Deckgläschen anwachsen. Die Pankreasinseln/zellen wurden immer zwei Tage nach der Isolierung zu Messen verwendet.

Eine biochemische Charakterisierung der Pankreasinseln fand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig statt und hat die folgenden Parameter umfasst: Messung der ATP-Konzentration, Messung des Sauerstoffverbrauchs und Messung des mitochondrialen Membranpotentials.

### *Lösungen*

Für alle Zellmessungen wurde ein modifizierter Krebs-Ringer-Puffer (KR) eingesetzt:

650 ml einer KR-Lösung enthalten:

500 mL NaCl-Lösung 0.90%ig

85 mL NaHCO<sub>3</sub>-Lösung 1.30%ig

20 mL KCl-Lösung 1.15%ig

20 mL Hepes-Albumin-Lösung(NaOH-alkalisch, 154 mM) 7.70%ig

15 mL CaCl<sub>2</sub>-Lösung 1.62%ig

5 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung 2.11%ig

5 mL MgSO<sub>4</sub>-Lösung 3.82%ig

Die KR-Lösungen wurden jeweils frisch am Messtag präpariert und für die Stimulationmessungen die entsprechenden Substanzen hinzugefügt. Die Konzentration bei der Glucose lag bei 30 mm/L, die Konzentration von  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) bei 10 mm/L.

Für die Kalium-Stimulierungsmessungen wurde die Krebs-Ringer-Lösung mit Kaliumchlorid (149 mg) versetzt, so dass die finale Konzentration ca. 40 mmol/L betrug.

### *Calcium-Messungen*

Zum Anfärben der Zellen mit den Calcium-Farbstoffen wurden die AM-Formen (Acetoxymethylester) der Farbstoffe verwendet. Aus denen Stammlösungen des jeweiligen Farbstoffes in DMSO wurden durch Verdünnen mit KR-Puffer Färbelösungen hergestellt. Zum besseren Anfärben wurde im 2:1 Verhältnis zum Farbstoff eine Pluronsäure-Lösung (20 % w/v Pluronic F-127 in DMSO) dazugegeben. Die Konzentration der verdünnten Farbstoff-Lösung betrug 2  $\mu$ mol/L. Die Zellen wurden ca. 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit KR-Lösungen gewaschen. Als Medien wurden KR-Lösung mit 5 mmol/L Glucose und KR-Lösungen mit 5 mmol/L Glucose und erhöhter Kaliumkonzentration (40 mM) verwendet.

### *Stimulationsmessungen*

Alle Messungen wurden mit einer selbst-konstruierten Perfusionkammer durchgeführt. Die Kammer wurde bei allen Messungen durch Heizdrähte auf 37°C erwärmt und zusätzlich eine Objektivheizung eingesetzt. Das Medium wurde mit einer Peristaltik-Pumpe mit 0.5 mL/min

durch die Kammer gepumpt. Die Stimulations-Medien wurden auf 37°C vorgewärmt und ständig mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid) begast.

Bei der Stimulation wurde mit einer Wellenlänge von 780 nm und 16 Strahlen gearbeitet. Die mittlere Leistung vor dem Eintritt ins Mikroskop war ca. 100 mW. Die Gatebreite betrug 1000 ps, um genügend Autofluoreszenz zu sammeln. Als Objektive wurde ein 40x Zeiss Öl-Immersionsobjektiv Plan-Neofluar (1.3 NA) (Pankreas-Inseln) und ein 63x Zeiss Ölimmersionsobjektiv (Plan-Apochromat, 1.4 NA (Einzelzellen) verwendet. Für eine Messung der Fluoreszenzlebensdauer wurden 22 Messpunkte (Intensitätsbilder) aufgenommen und kontinuierlich wiederholt. Der zeitliche Abstand der Messpunkte betrug 400 ps. Beim Wechsel des Mediums auf Glucose/KIC/erhöhtes Kalium wurden die Pumpe und die Messung gestoppt. Nach dem Wechsel wurde die Pumpe wieder betätigt und der Anstieg/Abfall der Intensität der Fluoreszenz durch kontinuierliche Aufnahme von Bildern mit dem ICCD-System beobachtet, bis jeweils wieder ein konstantes Intensitäts-Plateau (bei Glucose) erreicht bzw. der Anstieg (bei KIC) abgeschlossen war. Erst dann wurden die FLIM-Messungen fortgesetzt. Die entsprechende totale Fluoreszenzintensität einer einzelnen FLIM-Messung wurde aus den 22 Bildern über Summierung errechnet. Die genannten Parameter bilden einen Kompromiss zwischen schneller Messung (Messzeit pro FLIM-Bild 2-3 min) und einer ausreichenden Anzahl an Punkten, um das Verhältnis von freiem zu gebundenem NAD(P)H bestimmen zu können.

## 4.2 Lösemittel und Farbstoffe

Lösemittel wurden ausschließlich in den Spektroskopie-Qualitäten von Sigma-Aldrich verwendet. Chemikalien und Fluorophore von Sigma-Aldrich konnten ohne weitere Aufreinigung verwendet werden. Das Paraffin/Mineralöl einiger Hersteller wies signifikante Autofluoreszenz im UV-Bereich auf, während sich beim Mineralöl von Acros die geringste Autofluoreszenz zeigte.

Zum Anfärben der Zellen wurden Calciumfarbstoffe und Calcium-Kits von Invitrogen benutzt.

## 4.3 Benutzte Programme

Für die Aufnahme der biologischen Daten wurde Davis 6.2.2 von LaVision, Göttingen, eingesetzt. Mit dieser Software wurden der HRI, die CCD-Kamera und der Motor für die Z-Achsen-Verstellung gesteuert. Desweiteren wurde die Software zur monoexponentiellen Auswertung von FLIM-Daten benutzt.

Die Steuerung des Galvoscaners übernahm die Software Inspector (LaVision Biotech, Bielefeld) mit der die Scanfeldgröße an die jeweiligen Bedingungen der Zellmessungen angepasst wurde.

Die Anisotropiedaten wurden mit dem Programm PicoHarp der Picoquant GmbH, Berlin aufgenommen und mit einem in der AG Gericke geschriebenen MATLAB-Programm ausgewertet (s. auch Abschnitt 4.9).

Alle weiteren Daten und Bilder wurden mit Origin (Originlabs), mit selbstprogrammierten Auswerteprogrammen (s. Kapitel 7) und mit der vom National Institutes of Health geschriebenen Open-Source Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) ausgewertet.

#### **4.4 Meßmethoden**

Es gibt eine Reihe von Methoden die Fluoreszenzlebensdauer bildgebend zu messen. Sie lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: Messungen in der Zeit- und in der Frequenz-Domäne. Auf die Messungen in der Frequenz-Domäne soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie in dieser Arbeit nicht benutzt wurden. Zur Zeit-Domäne gehören die in der Arbeit verwendeten Methoden wie das etablierte Time correlated single photon counting (TCSPC) und auch die „Time Gated-Technik“.

##### **4.4.1 Time-Gated Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)**

Bei dieser Messmethode werden die Fluorophore meistens mit ultrakurzen Laserpulsen (im ps-Bereich oder bei Multiphotonen-Anwendungen auch im fs-Bereich) angeregt und das Fluoreszenzlicht mit einer CCD-Kamera in Kombination mit einem Lichtverstärker aufgenommen. Das Messprinzip ist in Abbildung 4-1 dargestellt. Der Lichtverstärker (Konstruktionsprinzip Multichannel plate, MCP) kann so eingestellt werden, dass nur innerhalb eines bestimmten Zeitfensters (Gate) mit variabler Breite das ankommende Signal verstärkt wird. Mathematisch entspricht dann das aus der CCD-Kamera ausgelesene Intensitätssignal der Fläche unter dem Zeitfenster; aufsummiert über viele Pulse. Das Zeitfenster wird nun relativ zum Zeitpunkt der Anregung des Laserpulses verschoben und so eine Abklingkurve aufgenommen. Bei simultanem Scanning des Laserfokus über die Probe erhält man durch die Benutzung der CCD-Kamera ein Bild, so dass man auch eine räumliche Auflösung der Fluoreszenz hat. Jeder Pixel entspricht einem Intensitätswert. Ein ganzes Bild ist dann eine Matrix aus Intensitätswerten (siehe Abbildung 4-1). Ein Nachteil ist die verringerte räumliche Auflösung, die durch die Verwendung des Lichtverstärkers entsteht.

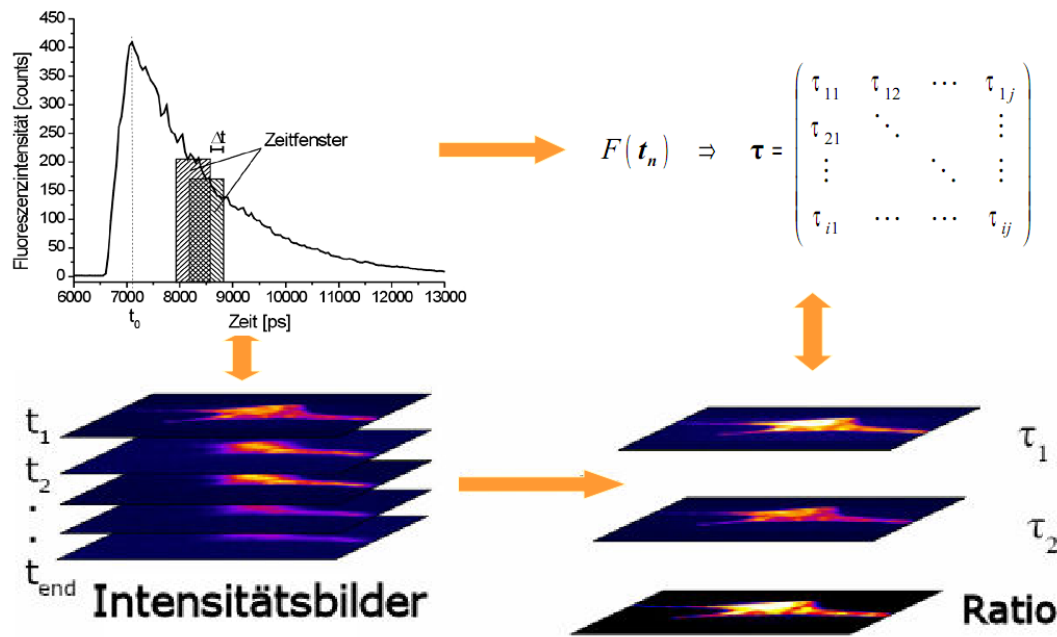


Abbildung 4-1 Schematische Darstellung des Messprinzips Time Gated Fluorescence Lifetime Imaging.

#### 4.4.2 Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC)

Anders als Time-Gated-Messungen basiert TCSPC auf der Detektion und Aufsummierung einzelner Photonen. Genaue Abhandlungen über Techniken, Detektoren und Beispielmessungen sind bei den Herstellern der TCSPC-Systeme zu finden [97]. Das Prinzip von TCSPC ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Ein Fluorophor wird von einem kurzen Puls angeregt. Die Emission eines Photons erfolgt zufällig nach dem Puls. Für genaue Messungen ist entscheidend, dass weniger als ein Photon pro Puls auftritt, d.h. die Anregungsraten dürfen bei starken Fluorophoren nicht zu hoch sein. Als Faustregel darf die Zählrate 5 % der Wiederholrate der Lichtquelle nicht überschreiten. Das Photon wird einem Detektor registriert (gezählt) und der Ankunftszeitpunkt relativ zum Laserpuls gespeichert. Wird dieser Vorgang über viele Pulse wiederholt, erhält man ein Photonenhistogramm, bei der die Anzahl der gezählten Photonen gegen die registrierte Zeit aufgetragen wird. Die Ankunftszeiten werden dabei auf sogenannte „time bins“ verteilt, die dann den Punkten einer Messkurve entsprechen. Bei den modernsten Systemen liegt die Breite der „time bins“ bei 1 ps, d.h. es können bei entsprechend schnellen Detektoren auch kürzeste Abklingzeiten gemessen werden. Höhere Zeitaufösungen werden nur bei Techniken wie „Pump-Probe“ oder „Fluorescence Upconversion“ erreicht.

Die Zeitauflösung eines TCSPC-Systems wird im Wesentlichen von der Zeitgenauigkeit der Registrierung des Emissionsphotons bestimmt. Diese hängt von der Art des verwendeten Detektors und dessen „transient time spread“ ab. Die „transient time“ bezeichnet das Intervall zwischen der Ankunftszeit bzw. Absorption eines Delta-Pulses an der Photokathode und dem

Maximum des analogen Outpulses des Detektors. Als „transient time spread“ bezeichnet man die Verteilung dieser Zeiten. Diese Verteilung kann auch wellenlängenabhängig sein. Als Maß für die Breite dieser Verteilung, wird typischerweise, die Halbwertsbreite (FWHM) angegeben. Hinzu kommt als Beeinflussungskomponente noch die Genauigkeit der Elektronik (Jitter), die bei ca. 10 ps liegt. Da diese Verteilungen meist nicht gaußförmig, sondern deutlich asymmetrisch sind, ist es für genaue Auswertung von TCSPC-Messungen nötig, diese Verteilung zu kennen (s. auch Abschnitt 4.8).

In Kombinationen mit einem synchronisierten beweglichen X-Y-Tisch oder einem Galvoscaner erlaubt es auch ein TCSPC-System Fluoreszenzlebensdauerbilder aufzunehmen. Hier entsprechen einzelne Bildpixel den Schritten des Tisches oder der Galvospiegel,

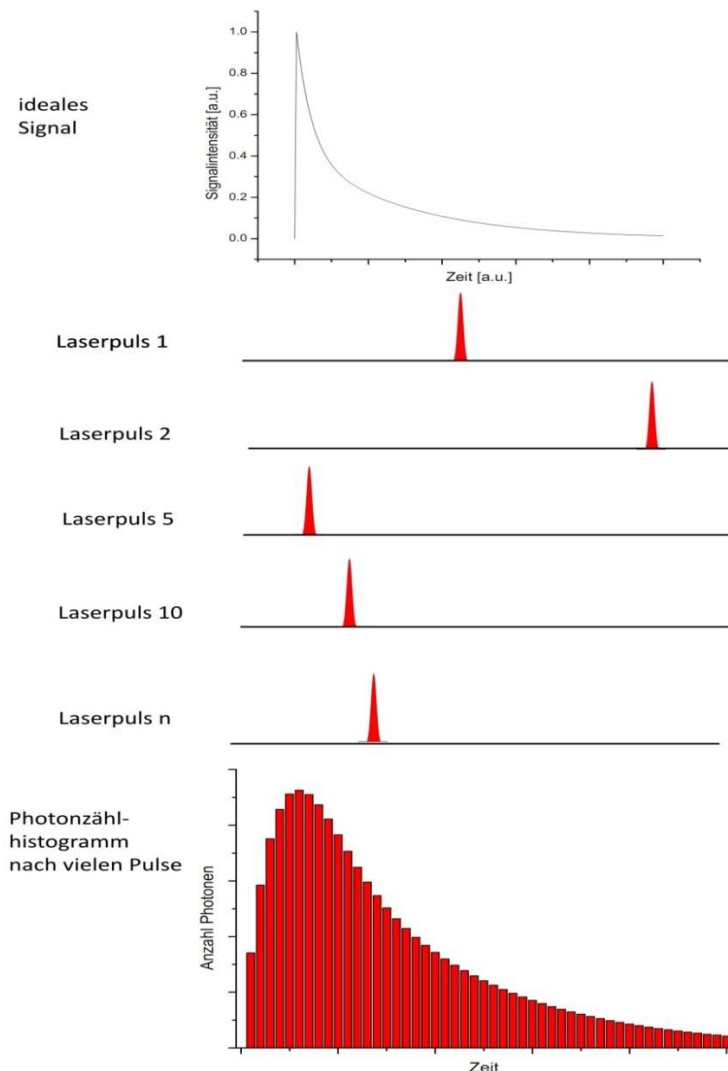


Abbildung 4-2 Messprinzip Time Correlated Single Photon Counting.



#### 4.5 Experimenteller Aufbau für biologische Messungen

Das Zweiphotonen-Mikroskop der AG Gericke wurde im Rahmen der Arbeit mehrfach erweitert und für die FLIM-Messungen optimiert. Entscheidend für die Qualität der Messungen war dabei der Aufbau eines Strahlteilerssystems (Beammultiplier) [98,99] in Kombination mit einem schnellen Galvoscaner. Durch die Aufteilung des Laserstrahls auf bis zu 64 Strahlen (d.h. Rasterung mit bis zu 64 Foki), ist es möglich nahezu gesamte die Leistung des Titan:Saphir Lasers zu nutzen, ohne eine für biologische Proben schädliche Menge an Leistung pro Fokus zu überschreiten (max. 10 mW pro Fokus) [100]. Ein weiterer Vorteil des Strahlteilers ist die schnellere Rasterung der Probe mit den 64 nebeneinanderliegenden Foki im Vergleich zur Rasterung mit einem Fokus. Da der Aufbau und das Design eines kommerziellen TriMScopes® (LaVision Biotech, Bielefeld) nicht eins zu eins übernommen werden konnte, wurde aus Einzelkomponenten ein ähnliches System aufgebaut. Diese Anpassung war nötig, da sowohl der Strahlengang als auch das Mikroskop anders als die kommerzielle Implementierung sind. Darüber hinaus wurden Optimierungen an der Abbildungsoptik des Mikroskops vorgenommen und eine Nachvergrößerungsoptik installiert. Sie erlaubt eine Änderung der Vergrößerung ohne Wechsel des Mikroskop-Objektivs. Durch diese Verbesserungsmaßnahmen konnte im Vergleich zum alten Aufbau eine bis zu 20x schnellere Aufnahmegeschwindigkeit als auch eine Verbesserung der Auflösung erreicht werden.

In Abbildung 4-3 ist eine schematische Darstellung der Apparatur zu sehen, an der die FLIM-Messungen durchgeführt wurden. Als Anregungsquelle dient ein von einem NdVO<sub>4</sub>-Laser (10 W, Verdi V-10, Coherent) gepumpter Titan:Saphir Lasers (MIRA 900 –B). Durch passives Kerr-Lens-Modelocking werden kurze Pulse (200 fs) mit einer Wiederholrate von 76 MHz generiert. Der Titan:Saphir Laser ist von 730 nm bis 840 nm durchstimmbar, je nachdem welcher Spiegelsatz verwendet wird. Die maximale Leistung von 1.6 W wird bei 800 nm erreicht. In der Praxis wurde der Laser weitestgehend nur zwischen 740 nm und 820 nm betrieben, da ausgekoppelte Laserleistung bei anderen Wellenlängen zu niedrig für effiziente und schnelle Messungen ist. Ein Teil des ausgekoppelten Laserlichts wird auf eine schnelle Photodiode gelenkt, die an eine Delayunit angeschlossen ist. Dies dient zum Triggern der Detektionseinheit.

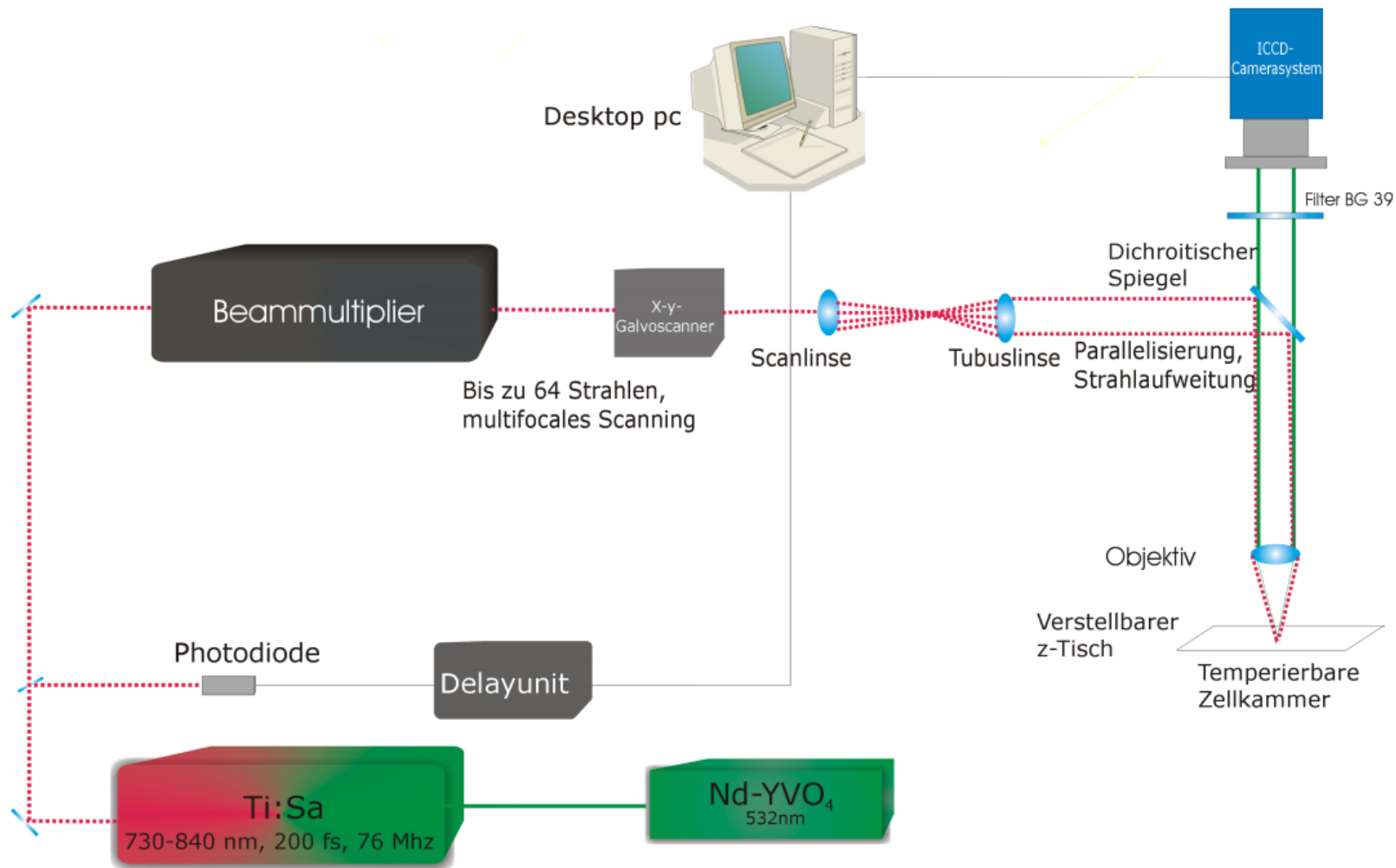


Abbildung 4-3 Schematischer Meßaufbau Zweiphotonenmikroskop TU Braunschweig.

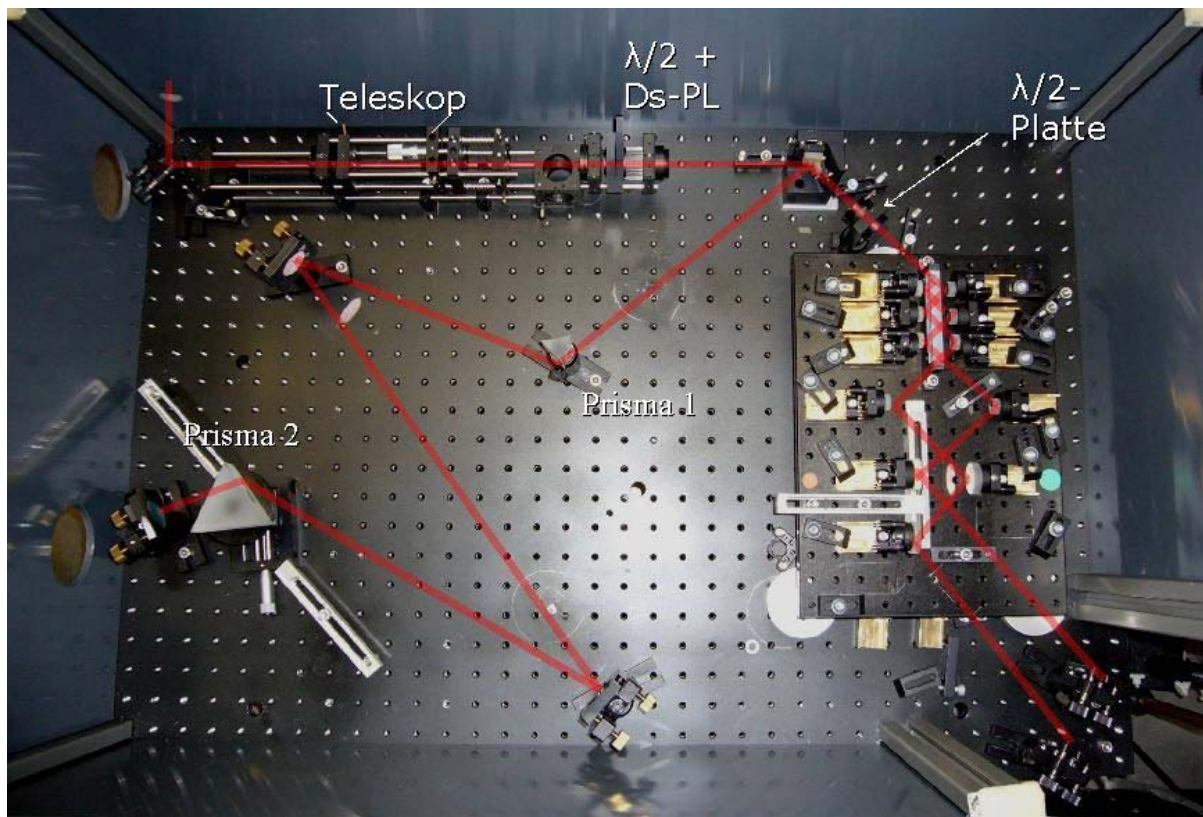
*Beammultiplier (TrimScope)*

Abbildung 4-4 Aufbau des Beammultipliers.

Der Aufbau des Beammultipliers ist an das von LaVision Biotech entwickelten Trimscope® angelehnt und wurde an die experimentellen Bedingungen des bestehenden Systems (Mikroskop und Laser) angepasst. Der in das Trimscope eingekoppelte Laserstrahl wird durch ein Teleskopsystem aus zwei Linsen geringfügig verbreitert und anschließend von einem Spiegel durch einen Pulskompressor bestehend aus zwei Prismen (SF-10) geschickt. Die Polarisation des Laserstrahls ist hier parallel zur Einfallsebene der Prismen und trifft im Brewster-Winkel in das Glasmaterial ein, um Reflektionsverluste zu vermeiden. Der Pulskompressor dient zur Dispersionskompensation. Durchläuft ein Femtosekundenpuls ein Vielzahl optischer Komponenten wie sie im Beammultiplier oder im Mikroskop vorhanden sind, kommt es aufgrund der unterschiedlichen Gruppengeschwindigkeiten der „roten“ und blauen Anteile des Pulses zu einem Auseinanderlaufen des Pulses; die zeitliche Breite des Pulses wird vergrößert. Die Stärke der Kompensation kann durch Verschieben des zweiten Prismas relativ zum Strahl eingestellt werden. Je nachdem durch welche Strecke an Glas durchlaufen wird, kann entsprechend kompensiert werden. Die Entfernung der Prismenspitzen beträgt ca. 1 m. Der Strahl wird durch beide Prismen zurückgeführt und von einem Spiegel nach Drehung der Polarisation in den eigentlichen Strahlteiler gelenkt. Zentrales Element ist ein Block aus zwei Glasplatten deren eine Seite so beschichtet ist, dass 50 % des IR-Lichts reflektiert und der andere Teil

transmittiert wird. Am ersten Punkt des Auftreffens entstehen so zwei Strahlen, die durch zwei zu beiden Seiten positionierte Spiegel ein zweites Mal in Richtung Strahlteilerplatte reflektiert werden. Auf den Spiegel erhält man dann nebeneinander liegende Punkte. Durch weitere Spiegel zu den Seiten des Strahlteilers erhält man bis zu  $2 \times 32$  Strahlen, die aus dem Trimschopf ausgekoppelt werden. Die zwei separaten Strahlbündel werden in einem polarisierenden Strahlteilerwürfel wieder vereinigt. Sie verlaufen nicht parallel, sondern werden durch Justierung der Spiegel im Strahlteiler an einem Punkt außerhalb zusammengeführt. Der Kreuzungspunkt liegt zwischen den Spiegeln eines Galvoscanners (GSI Lumonics, VM 500, 800 Hz). Die beweglichen Spiegel des Scanners rastern mit bis zu 64 Strahlen die Probe ab.

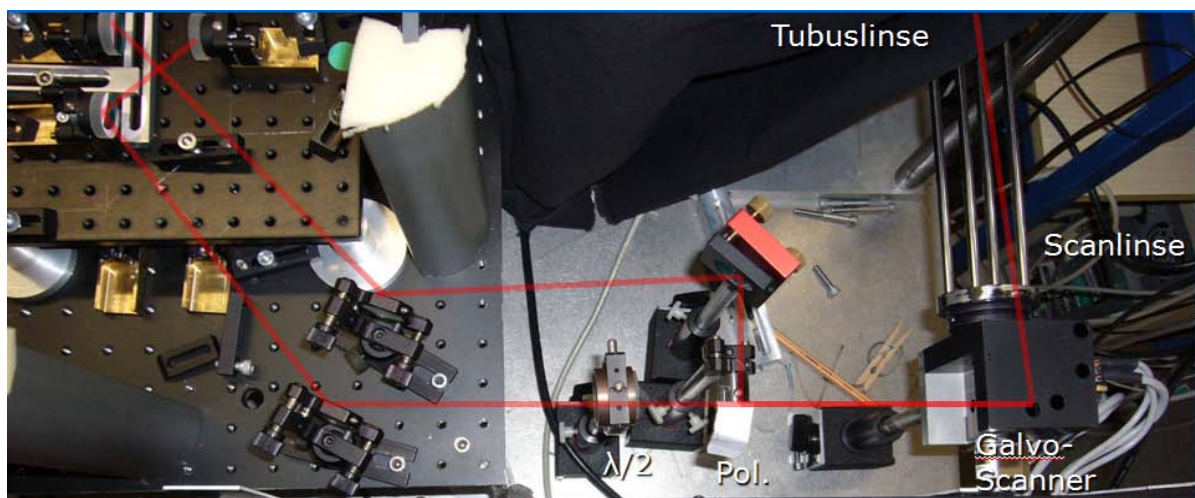


Abbildung 4-5 Strahlzusammenführung und Einkoppelsystem ins Mikroskop.

### *Mikroskop*

Als Basis für alle Messungen diente ein stark modifiziertes Axiostar-Mikroskop von Zeiss. Die bis zu 64 Strahlen wurden seitlich in das Mikroskop eingekoppelt. Durch ein Teleskop-System wird das Strahlprofil expandiert und sorgt für eine Überfüllung der Rückapertur des Objektivs. Der Strahlengang im Mikroskop wurde für unendlichfach korrigierte Objektive konzipiert. Ein dichroitischer Spiegel reflektiert Licht über 700 nm und transmittiert das Fluoreszenzlicht (ca. 350 – 600 nm). Im Emissionspfad sorgt ein BG39-Filter für Filterung von gestreuten bzw. reflektierten Anregungslicht. Zusätzlich werden Interferenzfilter eingesetzt, um selektiv die Emission von Fluorophoren beobachten zu können. Als Beispiel sei hier das selektive Beobachten der Autofluoreszenz von NAD(P)H durch Einsatz eines 460nm(80 nm) Filters genannt. Eine Kombination aus Tubuslinse (165 mm Brennweite) und einem 2.5fach vergrößernden Projektiv sorgt für die Abbildung der Fokalebene des Objektivs auf die Photokathode des ICCD-Systems.

### *Detektionssystem*

Als Detektionssystem kam ein ICCD-Kamerasystem (Picostar HR) von LaVision zum Einsatz, bestehend aus einer CCD-Kamera (Imager 3, 640x480 Pixel, Pixelgröße 9.9µm×9.9µm, maximale Countanzahl 12 bit), ein High Rate Image Intensifier (HRI) von Kentec Instruments Ltd und einer Delay Unit, die in Kombination mit dem HRI zeitaufgelöste Messungen (Time-Gated) ermöglichte. Das Gate kann in 25 ps Zeitabschnitten verschoben werden und ermöglicht so das Messen von Fluoreszenzlebensdauern.

### *Auflösung und Kalibrierung*

Die beugungsbegrenzte Auflösung eines Mikroskops wird durch die Anregungswellenlänge  $\lambda_{nm}$  und durch die numerische Apertur (NA) bestimmt. Zwei kleine Objekte lassen sich voneinander noch unterscheiden, wenn ihr Abstand größer als  $R$  ist:

$$R = \frac{\lambda_{nm}}{2NA} ; \quad NA = n \cdot \sin(\alpha_0) \quad (4.1)$$

Die numerische Apertur eines Objektivs hängt vom Brechungsindex  $n$  des verwendeten Immersionsmediums ab. Der Winkel  $\alpha_0$  ist der sogenannte halbe Öffnungswinkel und bestimmt die Lichtsammelleffizienz der Objektivs.

Die räumliche Kalibrierung wurde mit einem Objektmikrometer durchgeführt, welches ein als Durchlichtbild von der CCD-Kamera aufgenommen wurde. So konnte eine präzise Größeneinschätzung der Zellen und Inseln vorgenommen werden. Die laterale Auflösung und die Z-Auflösung können entweder über kleine (<200 nm) fluoreszierende Microspheres oder durch das Vermessen des Laserfokus in Farbstoff-Lösung bestimmt werden.

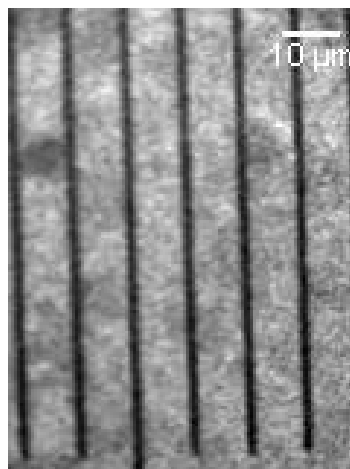


Abbildung 4-6 Durchlichtbild eines Objektmikrometers.

Die räumliche Auflösung eines Zweiphotonenmikroskops ist im idealen Fall kleiner als 400 nm (lateral) und kleiner als 1  $\mu\text{m}$  in axialer Auflösung. Die effektive Auflösung bei den Messungen mit dem FLIM-System wurde jedoch systembedingt und experimentell bedingt reduziert. Sie lag bei ca. 1.5  $\mu\text{m}$  in lateraler Richtung und 1.5  $\mu\text{m}$  in axialer Richtung. Die Gründe liegen in der Verwendung der MCP und Phosphorschirms im Intensitätsverstärker. Die MCP-Kanäle können sich gegenseitig beeinflussen, so dass die örtliche Lokalisierung der Fluoreszenzphotonen verschmiert wird. Die maximale räumliche Auflösung wird bei dem verwendeten System erst bei Benutzung von stark vergrößernden Objektiven (63x)/Projektiven erreicht. Dann entspricht ein Pixel der CCD-Kamera ca. 50 nm in der Probe. Ein Nachteil ist die deutlich verringerte Lichtintensität pro Pixel und das verkleinerte Blickfeld der Kamera. Ein weiterer Faktor, der die Auflösung beeinflusst, ist die Verschlechterung durch Hardware-Binning bei der Aufnahme der FLIM-Daten.

#### **4.6 Experimenteller Aufbau 2C2P-Anisotropie-Messungen**

##### *2C2P-Justage*

Der grundsätzliche 2C2P-Aufbau mit Femtosekundenpulsen wurde von Peker [101] und Quentmeier beschrieben [102], für die Messungen der 2C2P-Anisotropie wurden jedoch einige Modifizierungen und Optimierungen vorgenommen. Dieser optimierte Aufbau ist in Abbildung 4-9 dargestellt.

Die allgemeine Bedingung für das Auftreten von 2C2P-Absorption, ist die gleichzeitige (innerhalb von Femtosekunden) Wechselwirkung von zwei Photonen unterschiedlicher Wellenlänge mit dem Molekül. Experimentell bedeutet dies insbesondere bei Femtosekundenpulsen, dass eine sehr genaue zeitliche und räumliche Synchronisation der Pulse der unterschiedlichen Wellenlängen nötig ist. Photonen gleicher Wellenlängen, die aus einer Quelle wie dem Ti:Saphir Laser stammen, sind immer synchronisiert.

Prinzipiell ist es möglich zwei gepulste Laser für die Generierung von zwei unterschiedlichen Wellenlängen einzusetzen, jedoch müssen dann die Wiederholraten der Laser exakt übereinstimmen, damit die zeitliche Synchronisation auch im Mittel über viele Pulse gegeben ist. Daher wurde bisher bei den meisten gepulsten 2C2P-Messungen die zweite Wellenlänge über Frequenzverdopplung realisiert.

Die Fundamentale (800 nm) des oben beschriebenen Ti:Sa-Laser wird in einen  $\beta$ -Barium-Borat Kristall (BBO) fokussiert. Dort findet eine Frequenzverdoppelung statt, auch „Second Harmonic Generation“ (SHG) genannt. Das Verhältnis der Leistungen von SHG (400 nm) zu ausgekoppelten 800 nm Licht beträgt im optimalen Fall 1:10 (ca. 40 mW zu 400 mW). Das Licht aus dem Kristall wird von einer weiteren Linse, die konfokal zur Fokuslinse steht, gesammelt. Die Polarisationen von 800 nm und 400 nm stehen senkrecht zueinander gesammelt. Über einen dichroitischen Spiegel werden die Strahlen getrennt und laufen auf unterschiedlichen Wegen.

Über einen linear verfahrbaren Tisch (OWIS) ist die optische Weglänge des 800 nm Strahls variabel im Mikrometer-Bereich einstellbar. Dies sorgt für optimale zeitliche Synchronisation.

Sowohl die Polarisierung als auch die Leistungen der beiden Strahlen können völlig unabhängig voneinander eingestellt werden. Eine Kombination aus einer  $\lambda/2$ -Platte und einem Dünnschicht-Polarisator sorgt stufenlose Regelung der Leistung der Laserstrahlen. Lineare Polarisierungen (horizontal und vertikal) können jeweils über  $\lambda/2$ -Platten (B-Halle Nachfolg. GmbH, Berlin) und zirkuläre Polarisierung (rechts oder links) können über  $\lambda/4$ -Platten (B-Halle Nachfolg. GmbH, Berlin) eingestellt werden.

Die beiden Strahlen werden durch einen zweiten dichroitischen Spiegel wieder vereinigt und verlaufen dann kollinear. Durch ein Teleskopsystem mit zwei Quarzlinsen unterschiedlicher Brennweite werden beide Strahlen aufgeweitet, um die Rückapertur eines 10x Leitz Objektivs (Luft, 0.3 NA) optimal auszufüllen. Das Objektiv fokussiert beide Strahlen in eine Quarzküvette, in der sich die Lösungen der Farbstoffe befinden. Der Strahldurchmesser an der Strahltaile des Fokus beträgt ca. 1  $\mu\text{m}$ .

Für die räumliche Synchronisation muss die Position des roten Fokus mit der des blauen übereinstimmen. Bei normalen Objektiven ist die Brennweite jedoch wellenlängenabhängig. Der blaue Fokus ist daher näher an der Linse positioniert als der rote Fokus. Um das nicht achromatische Verhalten der Linsen und Objektivs zu kompensieren, wurde daher in den blauen Strahlengang ein zusätzliches Teleskopsystem aus zwei Linsen aufgebaut mit der die Position des blauen Fokus in allen drei Raumrichtungen frei eingestellt werden konnte.

Die Fluoreszenz wird mit einer 30 mm Quarzlinse im 90°-Winkel zur Ausbreitungsrichtung des Anregungslichts konfokal gesammelt und mit einer anderen Quarz-Linse auf das Detektorsystem fokussiert. Zur Filterung des Anregungslichts wird ein Breitbandfilter (330WB80, Omega Optical) und ein Notchfilter (400 nm, Semrock) eingesetzt. Für eine Grundjustierung



des 2C2P-Aufbaus wurde das oben genannte ICCD-Kamerasystem verwendet, da damit die räumliche Position der Foki besser visualisiert und sie dadurch besser überlappt werden können.

Für die Grundjustierung wird eine Küvette mit UV-Fluorophoren im Aufbau platziert und das Bild der beiden Foki (Dreiphotonen-Fluoreszenz vom 800 nm; Zweiphotonen-Fluoreszenz vom 400 nm) mit der ICCD-Kamera visualisiert. Der räumliche Überlapp wird dann durch ein Teleskopsystem im blauen Strahlengang erreicht. Der zeitliche Überlapp wird durch das Verfahren des Linear-Tisches erreicht, der genaue Überlapp wird durch ein drastisch erhöhtes Fluoreszenzsignal angezeigt. Anschließend werden die Intensität von blau und rot so eingestellt, dass sich maximales 2C2P-Signal bei minimalem TPE durch den blauen und minimalem TrPE durch roten Strahl ergibt. In der Praxis bedeutet dies viel Intensität beim roten Strahl (s. auch [9,10]) und wenig Intensität beim Blauen.

Ursprünglich wurde zur Justierung des räumlichen und zeitlichen Überlapp ein Pinhole und ein weiterer BBO zur Summenfrequenzgenerierung verwendet. Dies ist durch die oben beschriebene Methode nicht mehr nötig.

Der 2C2P-Aufbau wurde auf Wellenlängen von 400 und 800 nm optimiert. Sowohl die dichroitischen Spiegel als auch die  $\lambda/4$  und  $\lambda/2$  –Platten lassen kleine Änderungen der Wellenlänge zu, bei größeren Änderungen der Wellenlänge ( $>10$  nm) ist die Reflektivität/Transmission der dichroitischen Spiegel nicht mehr optimal und die Polarisierung verschlechtert sich.

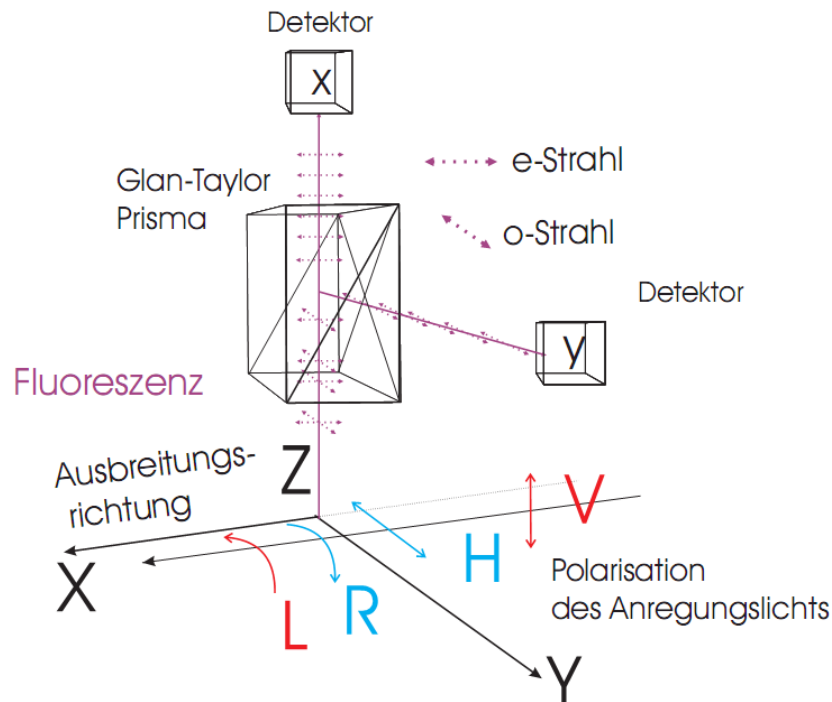
### *Anisotropieeinstellungen*

Prinzipiell lässt sich jeder Laser-Scanning-Aufbau dafür umrüsten, die Anisotropie der Fluoreszenz so zu messen, wie es in Abschnitt 2.4 beschrieben ist. Voraussetzung ist, dass die Polarisierung der Anregungsstrahlen linear polarisiert ist und die Richtung der Polarisierung variabel eingestellt werden kann. Während bei früheren Farbstofflasern die Polarisierung der ausgekoppelten Strahlen nicht 100 % und durch Polarisationsprismen gereinigt werden musste, so kann man bei Festkörper-Lasern weitestgehend darauf verzichten. Da die Anisotropie nicht direkt gemessen wird, sondern aus den Fluoreszenzsignalen von Kanälen berechnet wird, kommt es auf eine große Güte der Fluoreszenzdaten an.

Beim klassischen Aufbau wird die Anisotropie durch einen Emissionspolarisator und einen Detektor gemessen, d.h. es sind zwei separate Messungen/Einstellungen des Emissionspolarisators nötig, um die Anisotropie zu bestimmen. Um die Messzeit zu halbieren, wurde mit



zwei Detektoren und einem polarisierendem Strahlteiler gearbeitet. Der Aufbau ist in Abbildung 4-7 dargestellt.



**Abbildung 4-7** Schematische Darstellung für die Detektion der Fluoreszenzanisotropie durch ein Glan-Taylor-Prisma (90°-Aufbau); X,Y,Z sind die Laborachsen, x und y bezeichnen die Detektoren bei denen das Fluoreszenz jeweils parallel zu den entsprechenden Laborachsen polarisiert ist; L,R,H,V sind die Polarisationen der Anregungsphotonen.

Um beide Polarisationen simultan zu detektieren wurde ein Glan-Taylor-Prisma aus Kalkspat als polarisierender Strahlteiler eingesetzt. Der außerordentliche Strahl (e-Strahl) wird bei einem solchen Prisma ohne Ablenkung hindurch gelassen, der ordentliche Strahl(o-Strahl) wird in einem Winkel von  $72^\circ$  totalreflektiert. Es ist zu beachten, dass auch ein Teil des außerordentlichen Strahls reflektiert wird, jedoch in einem spitzeren Winkel als der o-Strahl. Er kann daher geblockt werden. Für alle Wellenlängen über 400 nm bieten sich auch polarisierende Strahlteilerwürfel, die die Polarisationen im  $90^\circ$ -Winkel trennen. Bei UV-Wellenlängen haben sie jedoch kein 100 % Auslöschverhältnis für beide Polarisationen. Glan-Prismen sind deutlich wellenlängenunabhängiger und weisen ein besseres Transmissionsverhalten im UV-Bereich auf, da sie aus Kalkspat sind.

Die Fluoreszenz wird in beiden Kanälen von einer 40 mm Quarz-Linsen gesammelt und auf die Detektoren fokussiert. Die Detektoren sind Einzelphotonen-Lawinen-Dioden (SPAD, PDM Series, MPD Bolzano) mit Detektorflächendurchmessern von 100  $\mu\text{m}$ . Sie haben besonders im sichtbaren Bereich eine hohe Detektoreffizienz von über 50 %. Im UV-Bereich beträgt die Effizienz jedoch nur noch ca. 10-20 %. Die Position der Detektoren lässt sich im cm-Bereich über zwei x-y-Stages variieren, um die sehr kleinen Detektorflächen optimal aus-

zuleuchten. Ein Nachteil dieser Dioden ist die Abhängigkeit der IRF von der Wellenlänge. Im sichtbaren Bereich des Spektrums werden FWHM von 50 ps erreicht, unter 400 nm verbreitert sich die IRF stark und ist asymmetrisch. Das TCSPC-System (PICOHARP 300 mit Router, Picoquant GmbH, Berlin) wird von einer schnellen Photodiode wie in Abschnitt 4.5 getriggert. Die Breiten für die einzelnen TCSPC-Kanäle sind von 4 ps bis zu 512 ps einstellbar.

Für Kontroll-Messungen und das Testen der Detektoren wurden Anisotropiemessungen im 2C2P-Mikroskop (s. [56]) durchgeführt. Hierbei ändert sich der Detektionsaufbau nicht. Es gibt jedoch einige Unterschiede bei der Berechnung der Anisotropie zwischen einem 90°-Aufbau wie er z.B. in Fluorimetern verwendet wird und einem Mikroskop-Aufbau. Um komplette Anisotropie-Messungen durchführen eignet sich der Mikroskopie-Aufbau aufgrund kollinearen Anregung und Detektion nicht.

#### *Polarisationseinstellungen*

Die zirkulare Polarisation wurde mit einem Fresnel-Rhombus und einem Polarisationswürfel (400-800 nm) überprüft (s. auch [102]). Aufgrund der unterschiedlichen Reflektivitäten des dichroitischen Spiegel für senkrecht und parallel polarisiertes Licht ist ursprünglich zirkular polarisiertes Licht elliptisch polarisiert. Daher muss die Drehung der  $\lambda/4$ -Platten entsprechend geändert werden.

Fällt zirkular polarisiertes Licht auf einen Fresnel-Rhombus so kommt 45°-zur Z-Achse des Laborkoordinaten-Systems orientiertes Licht heraus. Orientiert man einen Strahlteilerwürfel 45°- zur Z-Achse so erhält man maximale bzw. minimale Transmission in X-Richtung. Bei elliptisch polarisiertem Licht sind noch Anteile der anderen Polarisation vorhanden. Der Drehwinkel der  $\lambda/4$ -Platten dahingehend optimiert, dass das Verhältnis von maximaler und minimaler Transmission am größten wurde.

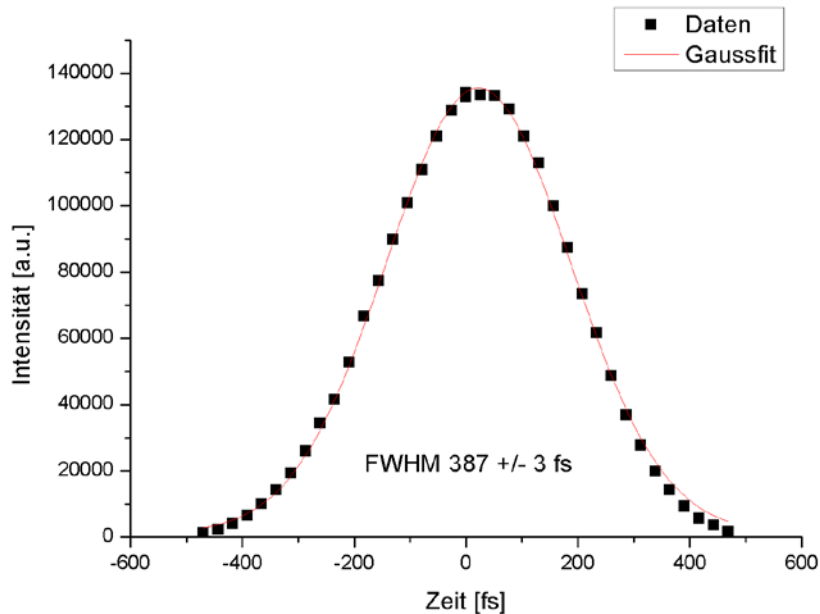
*Kreuzkorrelation*

Abbildung 4-8 Kreuzkorrelationskurve eines 800 nm und 400 nm Photons für beschriebenen Aufbau.

Mit einer Kreuzkorrelationskurve kann die Breite der Pulse in der Probe gemessen werden. Die Pulsbreite der Korrelationskurve hängt mit der mit Pulsform des Laserpulses zusammen. Bei Ti:Sa-Lasern wird die zeitliche Form meist über eine Sekans Hyperbolische quadrierte oder eine Gauß-Funktion beschrieben. Der FWHM-Wert der Kreuzkorrelationskurve ist deutlich breiter als der vom Hersteller angegebene von unter 200 fs. Dies ist auf die Verwendung vieler optischer Komponenten zurückzuführen; durch chromatische Dispersion verbreitert sich der Puls.

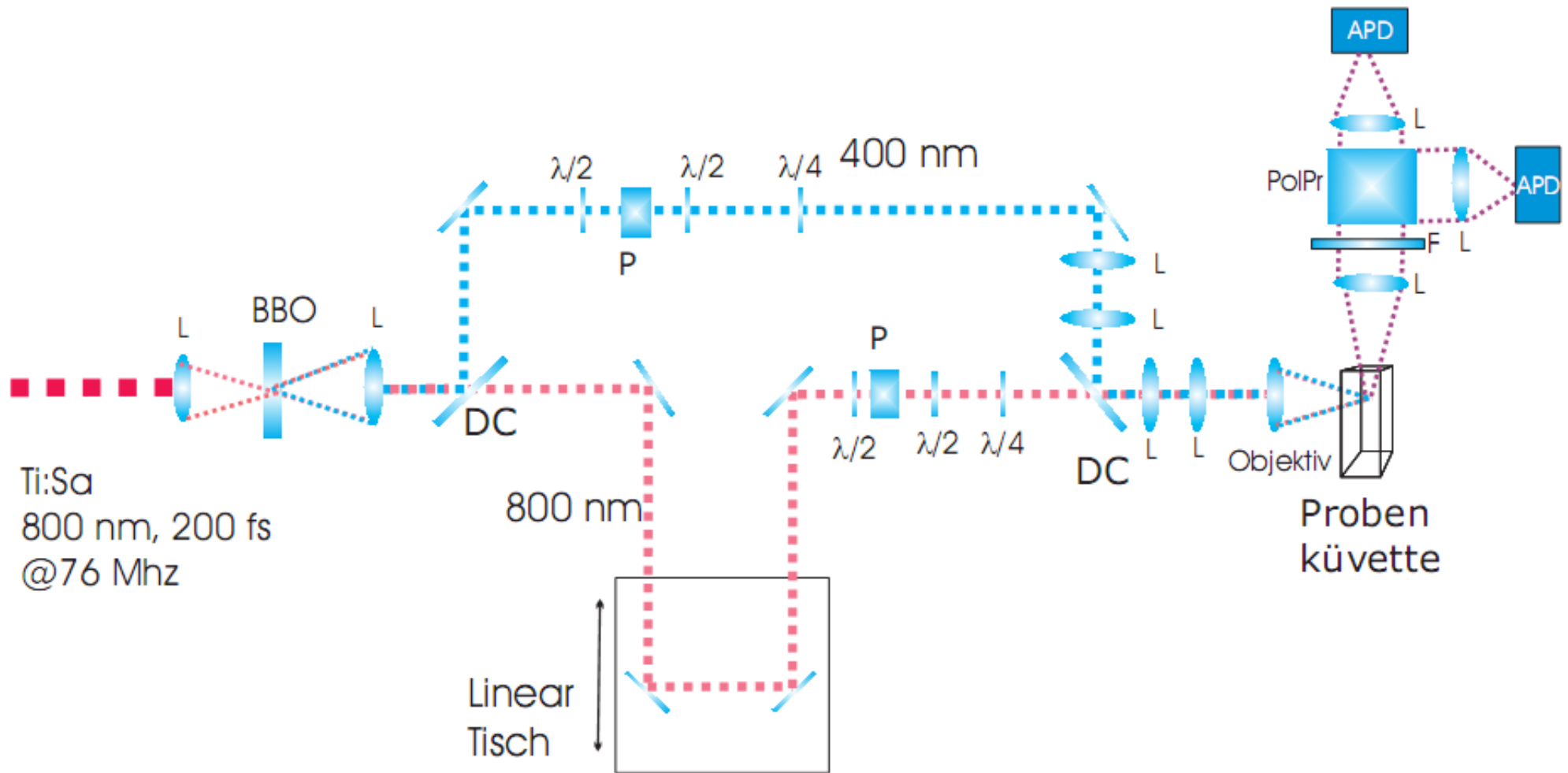


Abbildung 4-9 Zweifarben-Zweiphotonen-Aufbau für die Anisotropiemessungen (90°-Aufbau), L Linsen, DC Dichroitischer Spiegel, P Dünnschicht-Polarisator, F Filter, PolPr Glan-Taylor-Prismna, APD Avalanche Photodiode.

#### 4.7 Auswertemethoden FLIM

Das Messsignal  $F(t)$  ist proportional zur Anzahl der Moleküle  $N(t)$  im angeregten Zustand und setzt sich aus einer Basislinie, der Fluoreszenz und dem Rauschen zusammen, wobei das Abklingverhalten von Fluorophoren mit einer Summe von Exponentialfunktionen beschreiben werden kann:

$$F(t) = b + \sum_j a_j \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_j}\right) + n(t) \quad (4.2)$$

Im Einzelnen sind  $b$  die Basislinie,  $\tau_j$  die Fluoreszenzlebensdauer,  $a_j$  die Vorfaktoren (Anteile der Fluorophore an  $F(t)$  zum Zeitpunkt der Anregung) und  $n(t)$  das Rauschen, wobei  $b$  als Basislinie im idealen Fall vernachlässigt werden. Betrachtet man nur ein Fluorophor in Lösung ist das Abklingverhalten im idealen Fall monoexponentiell, bei einer Mischung aus zwei Fluorophoren biexponentiell. Für die Fluoreszenz von NADP(H) in allen biologischen Proben wurde in dieser Arbeit ein biexponentielles Modell angenommen, welches das Abklingverhalten hinreichend genau beschreibt.

Um nun nach der Messung einer Fluoreszenzabklingkurve in Zellen die Parameter wie die Lebensdauern und die Vorfaktoren zu bestimmen gibt es verschiedene Auswertemethoden. Als Grundlage dient dabei das Standardfahren der Minimierung der Fehlerquadrate. Ist das Verhalten monoexponentiell, bietet sich besonders für FLIM-Bilder eine lineare Regression an. Sie ist aufgrund der direkten Lösbarkeit der Gleichungen (für  $b=0$ ) besonders schnell. Die in den Experimenten zur Aufnahmen der FLIM-Daten verwendete Software (Davis 6.2, LaVision, Göttingen) hat eine einfache Auswerteroutine zum Berechnen von FLIM-Bildern durch lineare Regression. Sie erlaubt einen schnellen Überblick über den Bereich in dem sich die Lebensdauer bewegen.

Ist das Verhalten multiexponentiell ist eine analytische Lösung nicht mehr ohne weiteres möglich. Es kommen daher spezielle numerische Algorithmen zum Einsatz (LM, Prony, global Fitting). Da die Fluoreszenz der meisten biologischen Proben ein multiexponentielles Abklingverhalten zeigt (z.B. das biexponentielle Verhalten von NADH- und NADPH-Fluoreszenzabklingkurven), wurden bereits bekannte schnelle Algorithmen (die Prony Methode, modifizierte Prony methode, RLD (rapid evaluation method) als auch Methoden, die auf der Laplace Transformation basieren) für eine bi- und tri-exponentielle Approximation, d.h. die in der Biologie meist verbreiteten Annäherungen, in früheren Arbeiten untereinander verglichen und für den Einsatz in der Auswertung von FLIM-Daten angepasst. Niesner et al.

[103] konnten zeigen, dass die ursprüngliche Prony-Methode prinzipiell eine geeignete Auswerteprozedur darstellt, weil sie nicht nur schnell und einfach ist, sondern in den meisten Fällen ausreichend genau und relativ flexibel im Vergleich zu anderen schnellen Auswertemethoden (die Anzahl der Datenpunkte ist nicht begrenzt und benötigt keine weitere Randbedingungen) ist.

#### 4.7.1 Levenberg-Marquardt (LM)

Der Levenberg-Marquardt Algorithmus ist ein sehr etablierter Algorithmus zur Lösung von Optimierungsproblemen [104,105]. Er kommt in den meisten kommerziellen Datenauswerteprogrammen zum Einsatz und liefert zuverlässige Ergebnisse. Bei den meisten Optimierungsproblemen handelt es sich jedoch um nur um eindimensionale Daten, während die FLIM-Daten der Experimente mindestens zweidimensional sind. Bei Anwendung von iterativen Optimierungsverfahren wie LM hat dies schon bei kleinen Bildern einen erheblichen Rechenaufwand zur Folge. Er ist als iteratives Verfahren auch mit Leistung von heutigen Prozessoren relativ langsam. Aufgrund der dennoch sehr verlässlichen Ergebnisse auch bei verrauschten Daten, wurde zum Abgleich der Auswertergebnisse von alternativen Auswertverfahren wie Prony der Levenberg-Marquardt-Algorithmus in einer auf der Open-Source-Skriptsprache Python basierten Software umgesetzt und eine grafische Benutzeroberfläche zur einfachen Bedienung und Auswertung der Daten (Berechnung von FLIM-Bildern) geschrieben (siehe auch Kapitel 7 ).

#### 4.7.2 Prony-Methode

Die Prony-Methode wurde ursprünglich entwickelt, um biexponentelle und triexponentielle Abklingkurven voneinander zu unterscheiden. Sie entspricht quasi einer bilinearen Regression und basiert darauf, dass die Datenpunkte der Abklingkurven äquidistant sind. In folgenden Gleichungen wird die Prony-Methode dargestellt (siehe auch [103]):

Bei äquidistanten Abständen  $\Delta t$  gilt für das Messsignal  $I(t)$ :

$$I(n) = a_1 \cdot e^{-t_0/\tau_1} \cdot e^{-\Delta n/\tau_1} + a_2 \cdot e^{-t_0/\tau_2} \cdot e^{-\Delta n/\tau_2} \quad (4.3)$$

mit  $c = a \cdot \exp(-t_0/t)$  und  $v^n = \exp(-n\Delta t/t)$  folgt dann:

$$I(n) = c_1 \cdot v_1^n + c_2 \cdot v_2^n \text{ mit } n = 0, 1, 2, \dots, m \quad (4.4)$$

$v_1$  und  $v_2$  sind Lösungen einer quadratischen Gleichung:

$$(v - v_1)(v - v_2) = v^2 + s_1v + s_2 \equiv 0 = \begin{cases} v_1^2 + s_1v_1 + s_2 = \varphi(v_1) = 0 \\ v_2^2 + s_1v_2 + s_2 = \varphi(v_2) = 0 \end{cases} \quad (4.5)$$

Multipliziert mit  $c_1v_1^n$  bzw.  $c_2v_2^n$  ergibt sich:

$$c_1v_1^2 + c_2v_2^2 + s_1(c_1v_1 + c_2v_2) + s_2(c_1 + c_2) = I_2 + s_1I_1 + s_2I_0 = 0 \quad (4.6)$$

Daraus folgt:

$$\begin{aligned} I_2 + s_1I_1 + s_2I_0 &= 0 \\ I_3 + s_1I_2 + s_2I_1 &= 0 \\ \vdots \\ I_m + s_1I_{m-1} + s_2I_{m-2} &= 0 \end{aligned} \quad (4.7)$$

Die Parameter  $s$  lassen sich nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate lösen:

$$\begin{aligned} F &= \sum_{n=2}^m (I_n + s_1I_{n-1} + s_2I_{n-2})^2 \equiv \text{Minimum} \\ s_{1,2} \quad v_{1,2} &\Rightarrow \boxed{\tau_{1,2} = n\Delta t / \ln(v_{1,2})} \\ c_{1,2} &\Rightarrow \boxed{a_{1,2} = -\ln(c_{1,2}) \cdot \tau / t_0} \end{aligned} \quad (4.8)$$

Prony ist aufgrund seiner nichtiterativen Methode sehr schnell, mehr als eine Größenordnung schneller als gewöhnliche Methoden (LM). Der gewählte Algorithmus wurde in einer auf der Open-Source-Skriptsprache Python basierten Software umgesetzt und eine grafische Benutzeroberfläche zur einfachen Bedienung und Auswertung geschrieben. Das Programm wurde sowohl an computergenerierten Daten (mit und ohne experimentelles Rauschen) überprüft, um die optimalen Einstellungen für Aufnahme der experimentellen Daten zu finden, d.h. die Anzahl und Abstand der Datenpunkte, bei denen die Prony-Methode die geringste Anzahl von Fehler erzeugt. Die Ergebnisse sind in folgenden dargestellt. Es wurden künstliche FLIM-Daten erzeugt deren Parameter Gleichung 4.9 entsprachen:

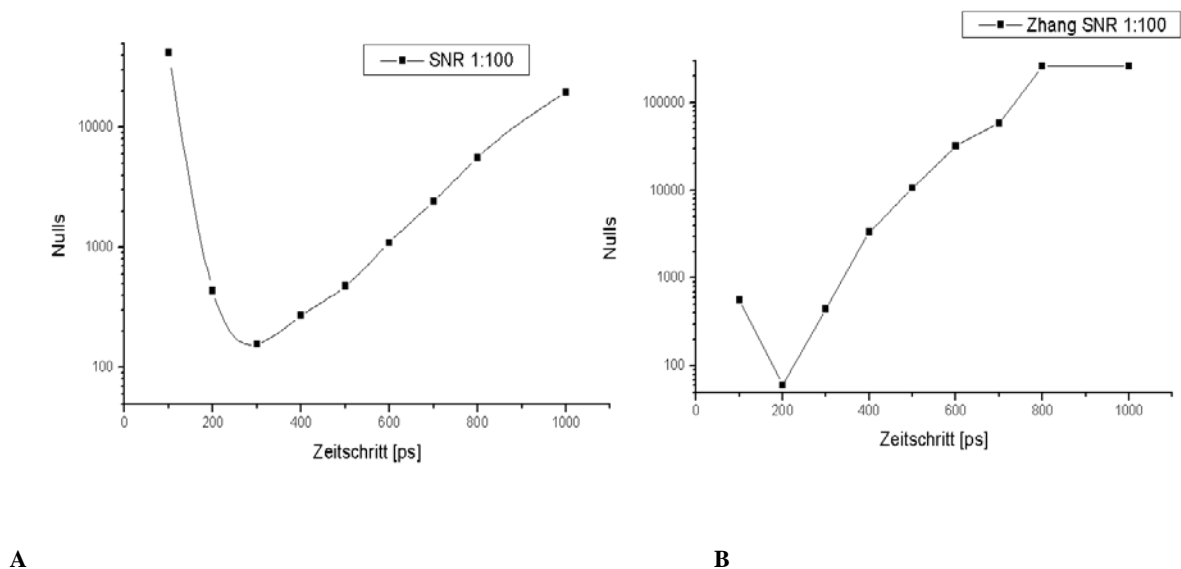
$$F(t) = 400 \cdot \exp\left(-\frac{t}{450}\right) + 800 \cdot \exp\left(-\frac{t}{2350}\right) \quad (4.9)$$

In Abbildung 4-10 ist die Leistung der Algorithmen (Prony, modifizierte Prony-Methode nach Zhang) bei unterschiedlichen Abständen der Messpunkte ( $\Delta t$ ) zu sehen. Es zeigt sich, dass die Prony-Methode robuster und flexibler als die modifizierte Methode ist, da die Abstände der

Datenpunkte weniger Einfluss auf die Anzahl der Fehler haben. Ein Abstand von 300-400 ps ist optimal.

In Abbildung 4-11 zeigt den Einfluss des Rauschens auf die Genauigkeit der Methode. Mit sinkendem Signal zu Rauschen-Verhältnis steigt wie bei vielen anderen Methoden auch die Anzahl der Fehler. Aus den Ergebnissen, die in Abbildung 4-12 dargestellt sind, kann man wiederum schließen, dass für eine optimale Ermittlung der Fluoreszenzlebensdauer das Messfenster ca. zweimal bis dreimal so groß wie die längere Lebensdauer sein sollte.

Experimentell folgt aus diesen Ergebnissen, dass man mit einer relativen geringen Anzahl von Datenpunkten akkurate Ergebnisse für die Lebensdauern erhält. Eine geringe Anzahl von Datenpunkten pro FLIM-Messung ist gleichbedeutend mit erhöhter Aufnahmegeschwindigkeit.



**Abbildung 4-10** Anzahl der generierten Fehler gegen Abstand der Messpunkte (A Prony B modifizierte Methode nach Zhang) Signal zu Rausch-Verhältnis 100:1 (Quelle: R.A. Niesner, persönliche Information).



SNR	Zeitschritt 200 ps			Zeitschritt 400 ps		
	0-Stellen	$\tau_1$	$\tau_2$	0-Stellen	$\tau_1$	$\tau_2$
100:1	437	305 ps	1958 ps	271	426 ps	2318 ps
150:1	9	369 ps	2101 ps	15	439 ps	2342 ps
200:1	3	400 ps	2185 ps	1	444 ps	2350 ps
300:1	1	425 ps	2267 ps	0	448 ps	2355 ps

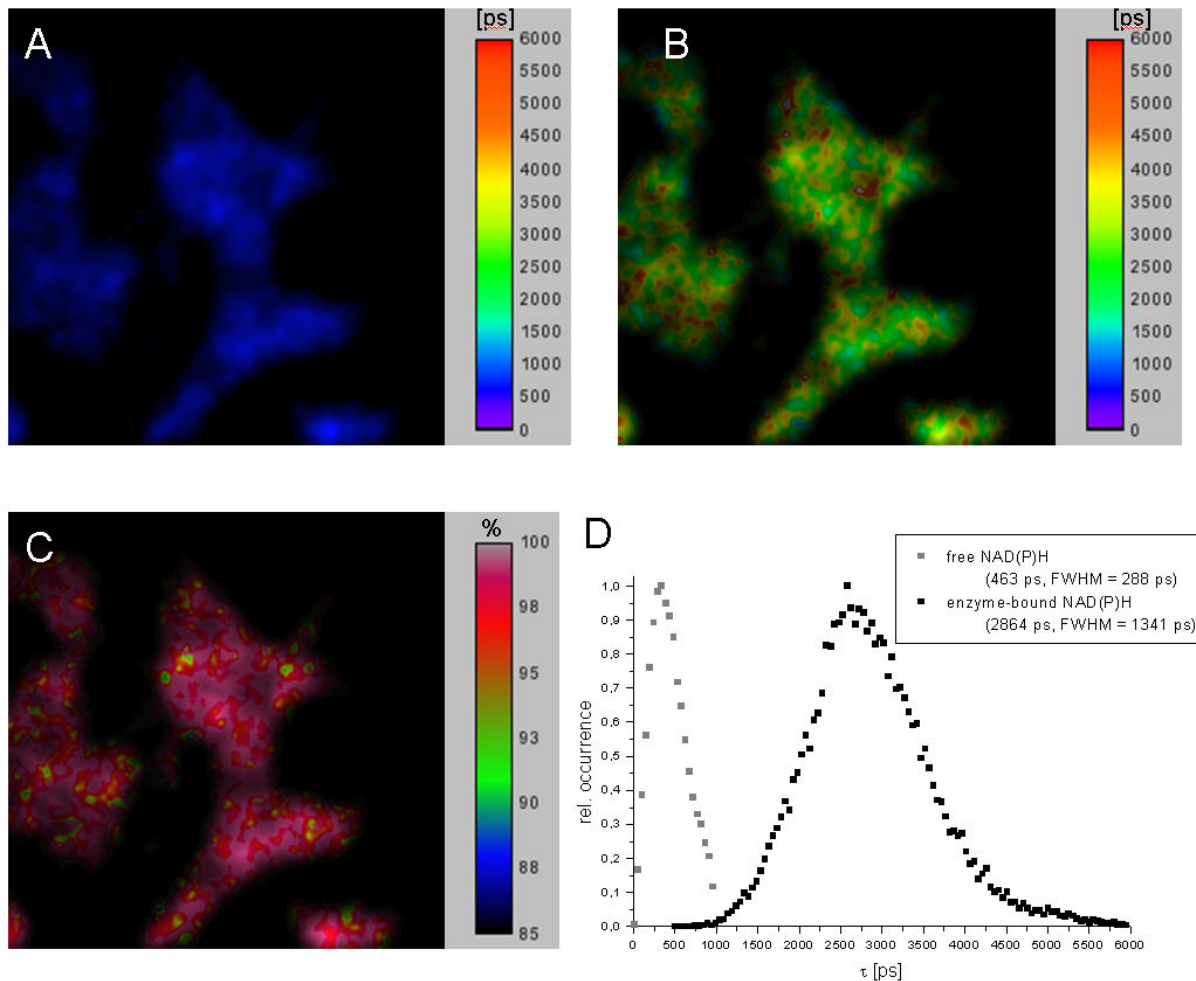
**Abbildung 4-11 Einfluss des Rauschens auf die Genauigkeit der ermittelten Parameter bei zwei verschiedenen Zeitschritten  $\Delta t$  (Prony-Methode) (Quelle: R.A. Niesner, persönliche Information).**

	0-Stellen	$\tau_1$	$\tau_2$	Std. Abw.
$1.5\tau_2$	11	290 ps	1650 ps	120 ps
$2\tau_2$	18	261 ps	1611 ps	90 ps
$3\tau_2$	66	212 ps	1552 ps	62 ps
$4\tau_2$	320	176 ps	1513 ps	48 ps
$5\tau_2$	1222	150 ps	1487 ps	40 ps

**Abbildung 4-12 Einfluss der Anzahl an Datenpunkten auf die Genauigkeit der Lebensdauern (Quelle: R.A. Niesner, persönliche Information).**

Zum Testen der Methode an experimentellen Datensätzen wurde in vorherigen Arbeiten von Niesner eine binäre homogene Mischung von Farbstofflösungen analysiert [103].

Auch an MIN6-Zellen wurde die Methode getestet. In Abbildung 4-13 sind Falschfarbendarstellungen der Verteilung der Lebensdauer in MIN6-Zellen zu sehen. Die gemessenen Lebensdauern entsprachen den in Zellen erwarteten Werten für NAD(P)H. Die erzielte Schnelligkeit und Genauigkeit der Auswertung ermöglicht also prinzipiell eine detaillierte und zuverlässige Beobachtung von FLIM-Daten.



**Abbildung 4-13** Lebensdauerbilder einer MIN6-Zelle: **A** tau1-Bild freies NADPH, **B** tau2-Bild Proteingebundenes NADPH, **C** Ratio-Bilder der verschiedenen **D** Histogramme der Lebensdauern (s. auch [106]).

Die Prony-Methode erwies sich aufgrund ihrer Schnelligkeit als gutes Werkzeug für beschleunigte Datenauswertung, um z.B. in kurzer Zeit einen Überblick über die Lebensdauern zu gewinnen. Die Methode eignet sich jedoch nur bedingt, um Aussagen über das Verhältnis der Vorfaktoren von biexponentiellen verrauschten Abklingkurven der Autofluoreszenz in Zellen zu treffen. Die erhaltenen Lebensdauern stimmten jedoch mit denen durch Levenberg-Marquadt-Fitting erhaltenen überein.

### 4.7.3 Global Fitting

Das sogenannte Global Fitting basiert im Allgemeinen darauf, nicht nur einen Datensatz zur Bestimmung der Parameter wie Lebensdauern und Vorfaktoren auszuwerten, sondern über mehrere Datensätzen gleichzeitig die Parameter zu optimieren (für FLIM-Daten im speziellen eine Optimierung über die Summe aller Bildpixel oder auch über ein kompletten Lauf einer Stimulationsmessung mit mehreren FLIM-Datensätzen). Dabei wird vorausgesetzt, dass eini-

ge Parameter innerhalb der Datensätze gleich sind, d.h. z.B. für FLIM-Daten, dass es von Pixel zu Pixel nur geringe Abweichung der Lebensdauer geben sollte. Der Vorteil bei dieser Art der Auswertung ist meistens die verbesserte Bestimmung der Parameter [60,107,108]. Die eigentliche Zeit bis Konvergenz des Algorithmus erreicht ist, ist jedoch nicht kürzer als LM. Macht man jedoch einige vereinfachenden Annahmen räumliche Konstanz der Lebensdauer, so erniedrigt sich die Rechenzeit drastisch.

Für die Auswertung der NADH-Stimulationsmessungen wurde die globale Fitmethode eingesetzt. Wie die Auswertung der Fluoreszenzlebensdauer-Bilder ergab konnte, die Lebensdauer im Verlauf einer Stimulationsmessungen als konstant angesehen werden, daher wurden nur die Vorfaktoren wurden variiert und der komplette Datensatz einer Stimulationsmessung global gefittet. Eine Veränderung im Verhältnis von gebundenen zu ungebundenem NAD(P)H bei Stimulierung sollte also in einer Änderung der Vorfaktoren resultieren.

#### 4.8 Einfluss der Instrument Response Function (IRF)

Sowohl für Fluoreszenzlebensdauermessungen und insbesondere bei den Anisotropiemessungen, muss man den Einfluss der Apparatfunktion auf das Signal beachten. Das Messsignal  $I(t)$  (hier als zeitabhängiges Signal) ergibt aus der Faltung (Convolution, Symbol  $*$ ) der Apparatfunktion  $IRF(t)$  mit dem eigentlichen Signal  $F(t)$ :

$$I(t) = IRF(t) * F(t) + n(t) \quad (4.10)$$

oder anders ausgedrückt:

$$I(t) = \int_{-\infty}^{\infty} IRF(\xi) \cdot F(t - \xi) d\xi \quad (4.11)$$

Graphisch lässt sich Gleichung 4.11 folgendermaßen vorstellen. Die  $IRF(\xi)$  wird gegen  $\xi$  aufgetragen,  $F(t)$  wird gespiegelt. Bei einem bestimmten  $t$  wird das Produkt von  $F(t-\xi)$  von  $IRF(\xi)$  gegen  $\xi$  aufgetragen. Die Fläche unter dieser Kurve entspricht dann  $I(t)$  zum Zeitpunkt  $t$ . Wird dies für alle  $t$  ausgeführt, erhält man die Messsignalkurve. Die Variable  $\xi$  dient hierbei also nur als Integrationsvariable und ist nicht von experimenteller Bedeutung. Eine exzellente graphische Beschreibung ist als Java-Applet unter „Joy of Convolution“<sup>1</sup> zu finden. Im Falle von diskreten Zeitpunkten oder Zeitkanälen wie bei TCSPC lässt sich das Integral vereinfacht

<sup>1</sup> <http://www.jhu.edu/~signals/convolve/index.html>

als Summe ausdrücken. Eine weitere Vereinfachung der Gleichung lässt sich durch die Veränderung der oberen Integrationsgrenze machen. Rein physikalisch gibt es vor dem Anregungspuls kein Fluoreszenzsignal, deswegen muss nur bis  $t$  integriert werden:

$$I(t) = \sum_{-\infty}^t IRF(\xi) \cdot F(t - \xi) d\xi \quad (4.12)$$

Die Größe der  $IRF(t)$  hängt von der Breite des Anregungspulses und der Art des verwendeten Detektors ab. Bei der Anregung mit Titan:Saphir Lasern ist die Breite des Anregungspulses deutlich geringer als die Breite der Antwortfunktion des Detektors, so dass die IRF nur noch vom Detektor abhängt. Heute sind die schnellsten TCSPC-Detektoren Multichannel plate – Photomultiplier (MCP-PMT). Sie haben eine FWHM von 30 ps. Im Vergleich zu den im Experiment verwendeten Lawinen-Photodioden (SPAD, Single Photon Avalanche Diode) haben sie im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums eine deutlich geringe Photonen-Detektionseffizienz.

Unter Anwendung bestimmter Algorithmen (Fast Fourier Transform, Wavelet Transformation oder auch Bayes-basiert), lässt sich das eigentliche Signal  $F(t)$  durch Entfalten herausbekommen, solange man die  $IRF$  kennt oder abschätzen kann (Deconvolution). In der Bildverarbeitung werden diese Techniken zur Bildverbesserung angewandt, um z.B. aus einem unscharfen Bild ein scharfes Bild zu rekonstruieren. Jedoch eignen sich diese Methoden nur bedingt für Daten, bei denen man  $F(t)$  so genau wie möglich herausbekommen möchte. Rauschen und Messartefakte, können das erhaltene Signal  $F(t)$  verzerren.

Bei TCSPC-Messungen wird meistens die „reconvolutional“ Methode (Vorwärtsfaltung) verwendet, bei der eine angenommen Modell-Funktion mit der gemessenen IRF gefaltet wird und die Parameter der Ergebnisfunktion iterativ nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Least-Squares) an das gemessene Signal angepasst werden. Fast alle kommerziellen TCSPC-Auswertungsprogramme verwenden als Optimierungsalgorithmus die Levenberg-Marquardt-Methode.

### *Bestimmung der IRF*

Die IRF ist als diejenige Funktion definiert, die das System als Antwort auf eine Deltafunktion ausgibt. Bei dem verwendeten System kann die IRF also z.B. durch Messen der Antwortzeit des Systems auf Streulicht oder Anregungslicht bestimmt werden. Diese Methode eignet sich bei Detektoren, bei denen die Breite der IRF nicht von der Wellenlänge abhängt.

Bei dem verwendeten ICCD-Kamera-System hängt die Form des Messsignals im Wesentlichen von der eingestellten Gatebreite ab. Die Antwortfunktion ähnelt daher prinzipbedingt einer Rechteckfunktion. Die Messung wurde durch das zeitliche Abtasten von 800 nm Streulicht realisiert. In Abbildung 4-14 sind die gemessenen Antwortfunktionen bei verschiedenen Gatebreiten dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Breite des Plateaus der vorgegebenen Gatebreite entspricht. Die Breiten hängen zusätzlich auch stark von den angelegten Spannungen an der MCP ab, diese sind daher ab Werk kalibriert.

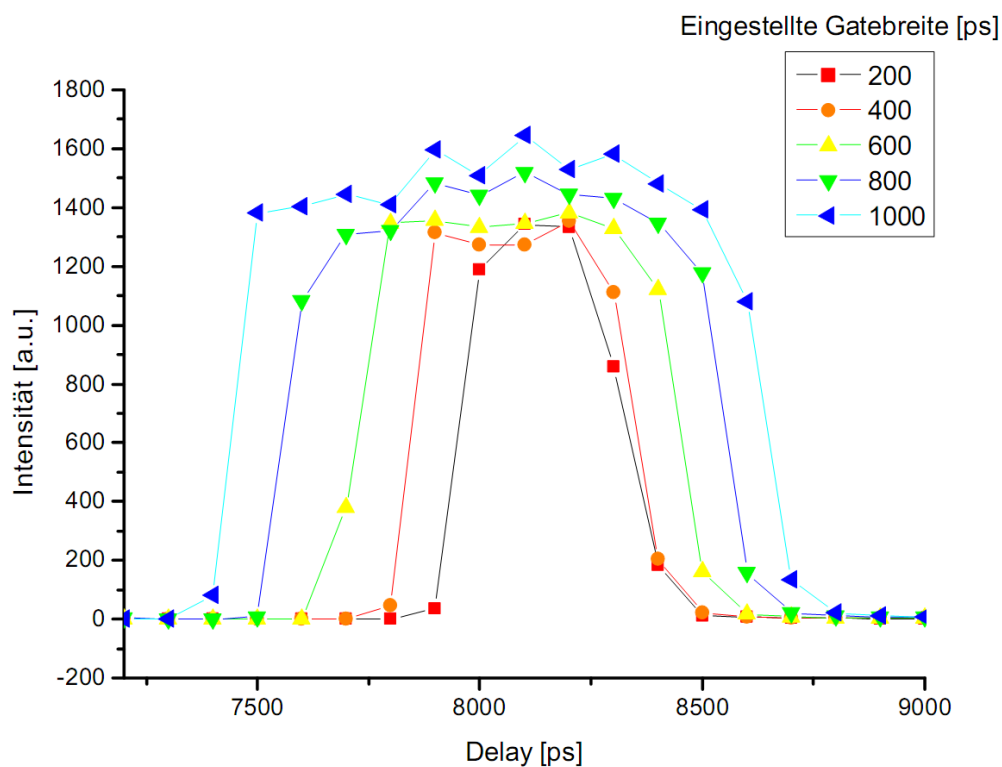


Abbildung 4-14 Antwortfunktion des Kamerasystems bei verschiedener Gatebreite, Bestimmung durch Detektion von 800 nm Streulicht.

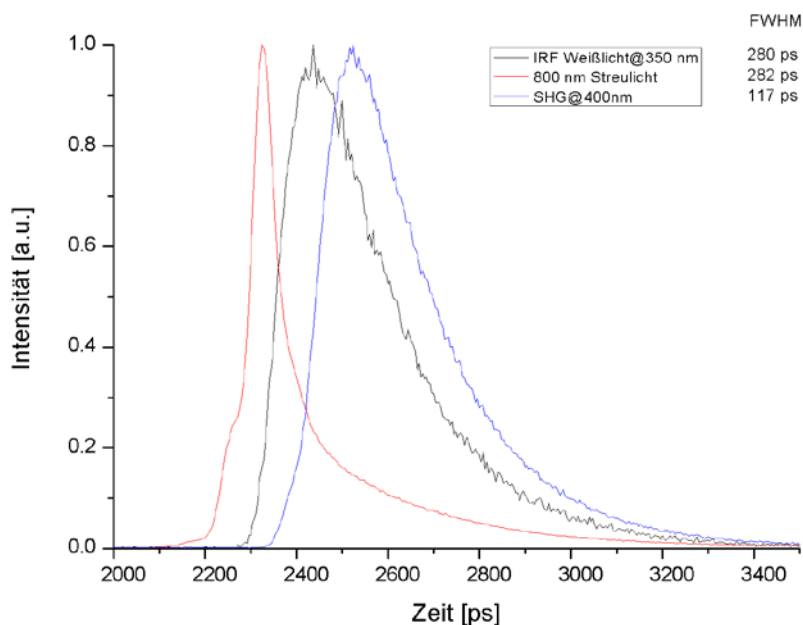


Abbildung 4-15 Antwortfunktion des TCSPC-Systems bei verschiedenen Wellenlängen.

Bei Lebensdauermessungen kann man die Antwortfunktion bei der Auswertung vernachlässigen, wenn die Lebensdauern im Vergleich zur IRF lang sind. Daten, die durch die IRF beeinflusst werden, werden dann beim Fitting nicht berücksichtigt. Bei monoexponentiellen Daten ergibt sich bei der Vernachlässigung der IRF kein Einfluss bei den Lebensdauern, bei biexponentiellen Daten, ist erhöht sich der Anteil der längeren Lebensdauer geringfügig. Bei der Auswertung der NADH-Daten von biologischen Proben kam es auf schnelle Messungen und schnelle Auswertungen von Lebensdauern an. Im Vergleich zu den Anisotropie-Daten wurden deutlich weniger Messpunkte für eine Datenkurve aufgenommen. Aufgrund der geringen Anzahl an Datenpunkten ist das Verrechnen von IRF und Messdaten deutlich unpräziser. Daher wurde für die bildgebende Lebensdauer der Einfluss der Anisotropie unberücksichtigt gelassen.

Da die IRF des TCSCP-Systems stark wellenlängenabhängig ist, wurden verschiedene Methoden zum Messen der IRF getestet. Herkömmliche Methoden greifen hier auf Streulicht-Messungen zurück. Für hoch zeitaufgelöste Multiphotonenanwendungen ist es geboten nicht linear erzeugte Antwortfunktionen zu verwenden [109]. Nicht linear erzeugte kurze Ereignisse sind z.B. Hyper-Rayleigh-Streuung oder Second Harmonic Generation. Frequenzverdoppeltes Licht (SHG) lässt sich durch Fokussierung von intensivem 800 nm Licht in doppelbrechenden Medien wie Harnstoff-Kristallen erzeugen. Die Benutzung der SHG-IRF beim Reconvolutional Fitting führte jedoch zu Spitzen in den Residuen-Kurven durch Abweichun-

gen im Anstieg der IRF im Vergleich zu den Messdaten. Daher wurde die IRF durch Weißlicht-Erzeugung in Paraffin generiert. Weißlicht-Erzeugung durch die Fokussierung von 800 nm Licht in Medien ist ein nichtlinearer Effekt und wird z.B. bei Pump-Probe Experimenten oder photonischen Kristall-Fasern verwendet, um über den gesamten sichtbaren Spektral-Bereich kurze Femtosekundenpulse zu erhalten [110]. Das Licht ist spektral über einen großen Bereich verteilt, von 350 nm bis zu 600 nm [111]. Mit einem Fluoreszenzfilter (330WB80) wurde das Weißlicht gefiltert und das erzeugte Signal an beiden Detektoren gemessen. Die Antwortfunktion beider Detektoren war identisch.

### *Anisotropiemessungen*

Für die Anisotropiemessungen muss der Einfluss der IRF berücksichtigt werden, da die Anisotropie eine berechnete Größe ist, d.h. jeder einzelne Kanal ist mit der IRF vom entsprechenden Detektor gefaltet:

$$r(t) = \frac{IRF_{\parallel}(t) * F_{\parallel}(t) - IRF_{\perp}(t) * F_{\perp}(t)}{IRF_{\parallel}(t) * F_{\parallel}(t) + 2(IRF(t) * F_{\perp}(t))} \quad (4.13)$$

Ist die Breite der IRF vergleichbar mit der Rotationskorrelationszeit, so zeigt sich ein nicht-exponentieller Verlauf der Anisotropiekurven. In Abbildung 4-16 sind drei Anisotropiekurven für PTP in Cyclohexan-Paraffin zu sehen. Die reale Rotationskorrelationszeit bewegt sich im Bereich von ca. 200 ps. Die Anfangsanisotropie haben ähnliche Werte, der Verlauf der Kurven ist dagegen stark unterschiedlich. Der Einfluss der IRF ist erst lange Zeit nach der Anregung minimal, erst dann haben die Kurven einen ähnlichen Verlauf. Ist die Rotationskorrelationszeit sehr viel kleiner als die IRF, so lassen sich aus der erhalten Anisotropiekurve keinen korrekten Rotationszeiten mehr erhalten, auch die die Anfangsanisotropie wird unterschätzt. In Abbildung 4-17 sind eine gemessene Anisotropiekurve für PTP in Dodekan, eine simulierte und eine durch Falten der Summen und Differenzkurven der Intensitäten mit der gemessenen IRF erhaltene Anisotropiekurve zu sehen. Durch eine Auswertung ohne Berücksichtigung der IRF können also nur Tendenzen in den Rotationskorrelationszeiten abgeschätzt werden, die Anfangsanisotropie hingegen ist viel zu niedrig und kann daher nicht zum Abschätzen des Winkels zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment benutzt werden. Die Entfaltung einer Anisotropiekurve ist stark fehleranfällig, und lässt sich bei realen IRFs nicht mehr mathematisch exakt formulieren. Daher müssen andere Methoden zur Auswertung kommen. Üblicherweise werden entweder dann der Zähler (Differenzkurve) und der Nenner (Summenkurve), oder die einzelnen Kanäle  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  separat ausgewertet

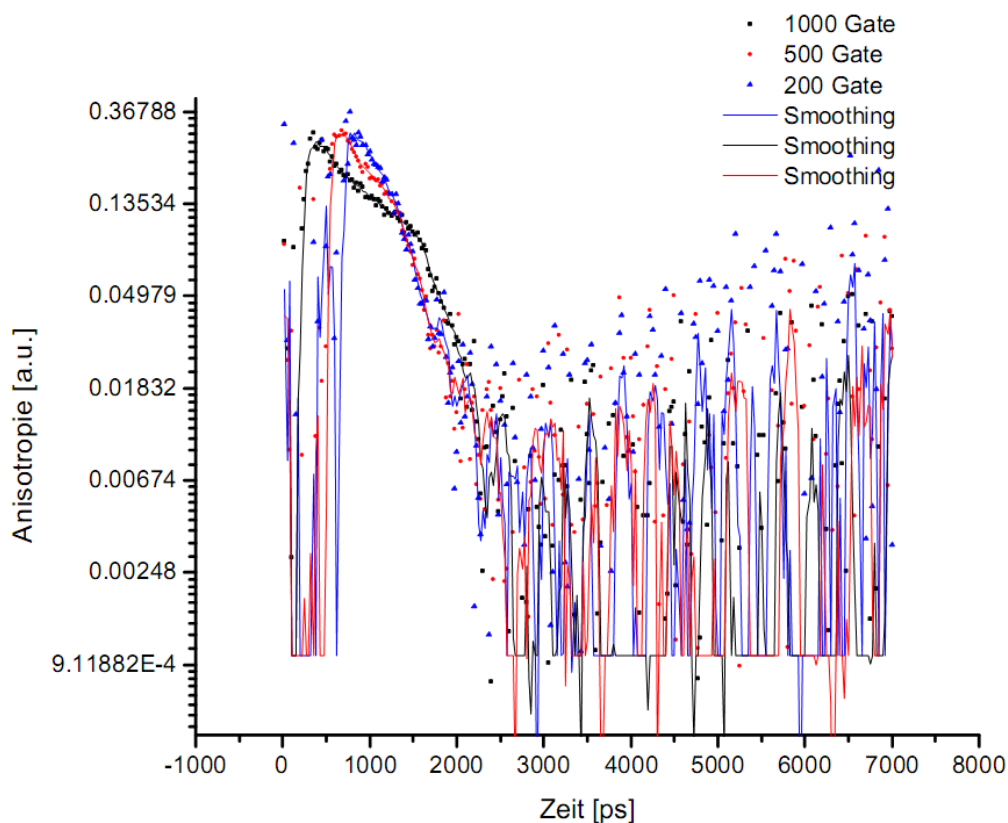


Abbildung 4-16 Anisotropieabklingkurven von PTP in 6:4 Cyclohexan-Paraffin bei verschiedenen Gatebreiten 200 ps, 500 ps, 1000 ps (90°-Aufbau), logarithmische Darstellung, Anregungswellenlänge 400 nm.

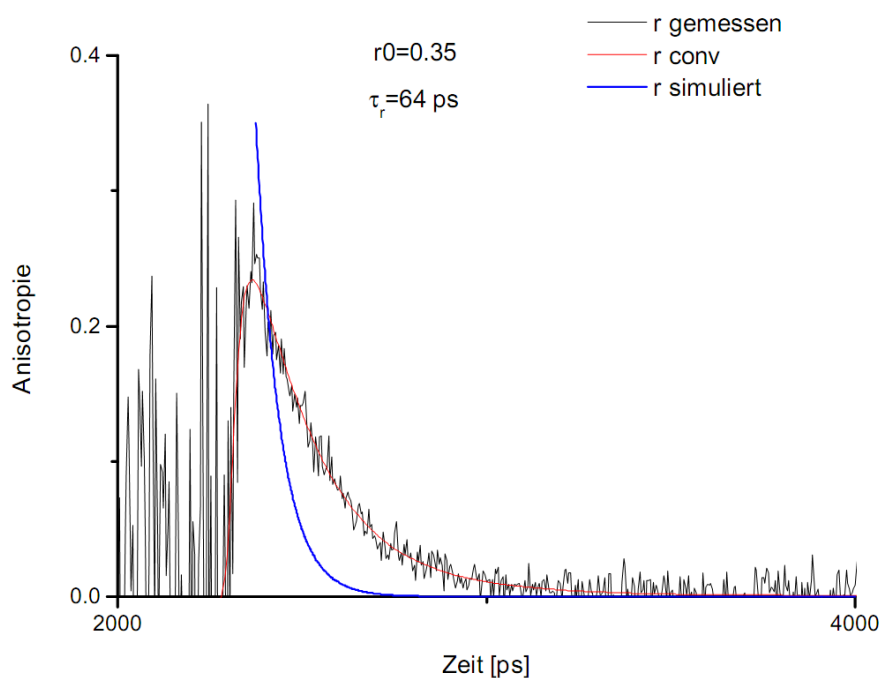


Abbildung 4-17 Vergleich zwischen gemessener Anisotropie für PTP in Dodekan (Mikroskop, TCSPC @400 nm), einem simulierten Anisotropiezerfall mit  $r_0 = 0.35$  und  $\tau_r = 64$  ps bei unendlich schmaler IRF und einem künstlich erzeugten Anisotropiezerfall mit Faltung (r conv, ( $r_0 = 0.35$  und  $\tau_r = 64$  ps).

Alle 2C2P-Anisotropiemessungen wurden mit dem TCSPC-System durchgeführt, da dort erstens bessere und rauschärmere Daten aufgenommen werden und zweitens die Datenauf-



nahme und Auswertung deutlich unkomplizierter als im Vergleich zu Kamera-System war. In Abbildung 4-18 ist graphisch dargestellt wie die mit dem TCSPC-System gemessenen-Kurven für die einzelnen Kanäle für ein Fluorophor mit einer Anfangs-Anisotropie von 0.57 und einer Rotationskorrelationszeit von 315 ps und einer Fluoreszenzlebensdauer von 1000 ps aussehen. Aufgrund der breiten IRF haben beide Kurven einen langsamen Anstieg, bei kurzen Zeiten wird der Verlauf der Kurve durch die Depolarisation der Fluoreszenz bestimmt, bei langen Zeiten nach der Anregung ist die Fluoreszenz komplett depolarisiert, die Kurven haben sich einander angenähert und zeigen den typischen Verlauf einer monoexponentiellen Fluoreszenzabklingkurve.

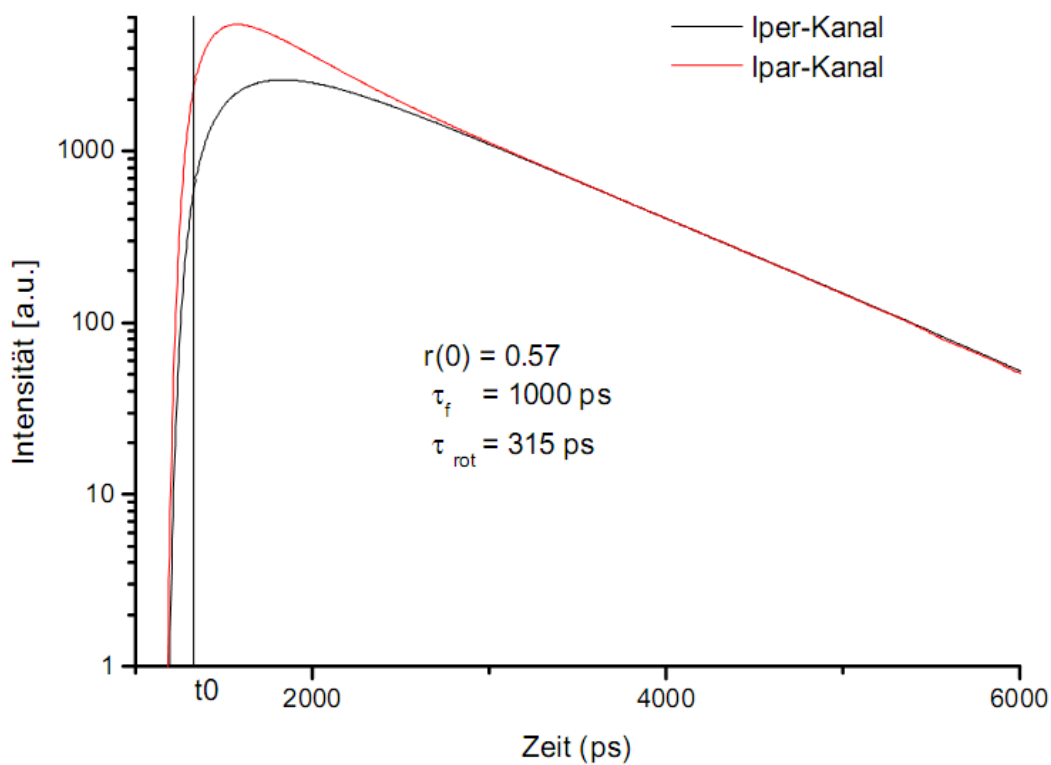


Abbildung 4-18 Simulierte Abklingkurven mit Faltung für die Fluoreszenzkanäle  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  ( $r(0) = 0.57$ ,  $\tau_{\text{rot}} = 315$  ps und  $\tau_f = 1000$  ps, die Anregung ist bei  $t_0 = 1336$  ps).

Da die Anisotropie  $r(t)$  und die totale Fluoreszenzintensität  $F(t)$  ( $I_{\parallel}$  und  $2I_{\perp} = 3F(t)$ ) miteinander verknüpft sind, lassen sich die zeitabhängigen Signale für die beiden Kanäle  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  in folgender Form schreiben:

$$I_{\parallel}(t) = 1/3[1 + 2r(t)]F(t) \quad ; \quad I_{\perp}(t) = 1/3[1 - r(t)]F(t) \quad (4.14)$$

Sowohl  $F(t)$  und  $r(t)$  können als Summen von Exponentialfunktionen beschrieben werden. Es ergibt sich dann für das zeitabhängige reale Signal unter Einbeziehung der IRF:

$$I_{\parallel}(t) = \int_{-\infty}^t IRF(\xi) \frac{1}{3} \sum_{i=1}^n A_i \exp\left[-\frac{(t-\xi)}{\tau_{f_i}}\right] \cdot \left[1 + 2 \sum_{i=1}^3 r_i \exp\left[-\frac{(t-\xi)}{\tau_{rot_i}}\right]\right] d\xi \quad (4.15)$$

$$I_{\perp}(t) = \int_{-\infty}^t IRF(\xi) \frac{1}{3} \sum_{i=1}^n A_i \exp\left[-\frac{(t-\xi)}{\tau_{f_i}}\right] \cdot \left[1 - \sum_{i=1}^3 r_i \exp\left[-\frac{(t-\xi)}{\tau_{rot_i}}\right]\right] d\xi \quad (4.16)$$

$A_i$  sind die Vorfaktoren bei unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern. Gibt es nur eine Lebensdauer und eine Rotationskorrelationszeit, sind  $I_{\parallel}(t)$  und  $I_{\perp}(t)$  biexponentielle Funktionen, die sich nur in einem präexponentiellen Faktor unterscheiden.

## 4.9 Auswertung Anisotropie-Messungen

### 4.9.1 Mikroskop-Messungen

Wie oben definiert ist die Anisotropie eine berechnete Größe, die von zwei Messwerten abhängt. Die Rotationskorrelationszeiten und die Anfangsanisotropie können durch passendes Fitting der einzelnen Kanäle (s.o.) errechnet werden. Soll dagegen Abnahme der Anisotropie graphisch dargestellt werden ist es entscheidend, dass es erstens keine zeitliche Verschiebung zwischen den beiden Kanälen und die Empfindlichkeit der Detektoren für beide Polarisationsmessungen gleich ist. Ist dies nicht der Fall wird die unterschiedliche Sensitivität im sogenannten G-Faktor bei der Berechnung der Anisotropie berücksichtigt.

$$r = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}} \quad (4.17)$$

Bei gleicher Sensitivität ist der G-Faktor 1. Für die Bestimmung des G-Faktors bei zeitaufgelösten Messungen gibt es unterschiedliche Methoden. Bei einer 90° Anordnung zum Messen der Anisotropie wie Abbildung 2-5 wird mit horizontaler Polarisation eingestrahlt, so dass beide Orientierungen des Emissionspolarisators senkrecht zur Anregungspolarisation sind. Das Verhältnis dieser beiden senkrechten Kanäle ist dann der G-Faktor [60].

Bei Messaufbauten, in denen die Emission kollinear zu Anregung beobachtet wird, wie beispielsweise in einem Mikroskop, wird der G-Faktor etwas anders berechnet [112]. Beide Arten der Beobachtung und Berechnung sind zur Verdeutlichung noch einmal in Abbildung 4-19 dargestellt.

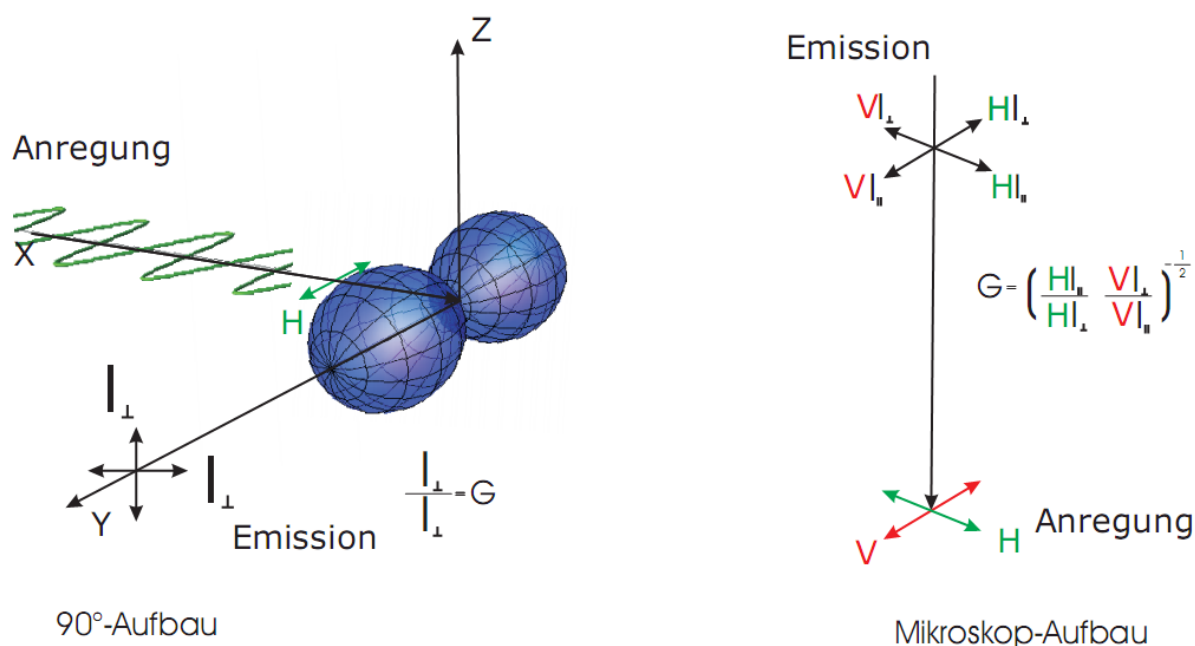


Abbildung 4-19 Schematische Darstellung zur Berechnung des Empfindlichkeitsfaktors  $G$  beim 90°-Aufbau und Mikroskop-Aufbau (kollinear).

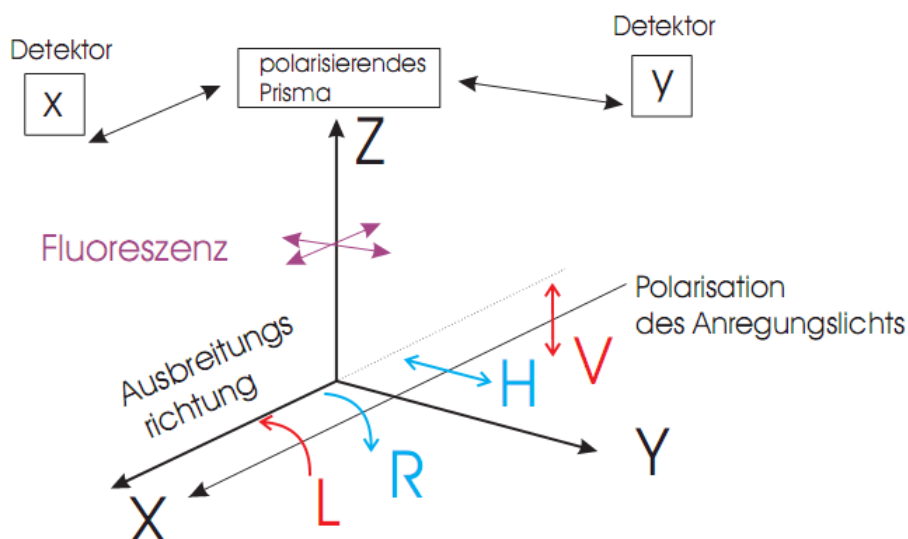
#### 4.9.2 M-Parameter-Berechnung

Wie in 2.5 dargelegt, beschreiben die M-Parameter eine Eigenschaft von Molekülen bzw. einen spektroskopischen Übergang dieser Moleküle. Ihre Größe und das Verhältnis zueinander sind von der Form des Zweiphotonentensors und des Winkels, die das Fluoreszenzdipolmoment, zu dem Tensorachsen einnimmt, abhängig. Die molekularen Parameter können u.a. durch das Messen der Fluoreszenzanisotropie bei Anregung mit unterschiedlichen polarisierten Photonen bestimmt werden. Hierbei wird immer vorausgesetzt, dass nach der Anregung keine Rotation des Moleküls stattfindet, d.h. es muss mit gefroren Proben bei unter 70 K gearbeitet werden oder es werden zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen in viskosen Lösemitteln durchgeführt bei denen man die Anisotropie bzw. Intensität zum Zeitpunkt der Anregung (=keine Rotation) ermittelt. Es kann dabei nur die relative Größe der Parameter bestimmt werden, da nicht die Absorption als absolute Größe, sondern die Fluoreszenzintensität gemessen wird. Sie ist u.a. von der Anregungsintensität, der Konzentration und Quantenausbeute der Fluorophore und der Detektionseffizienz abhängig. Fluoreszenzmessungen sind jedoch experimentell deutlich einfach zu realisieren und die Empfindlichkeit der Messungen ist deutlich höher als bei Absorptionsmessungen.

Grundsätzlich gibt es verschiedene experimentelle Möglichkeiten die M-Parameter zu bestimmen. Die Parameter nullter Ordnung lassen sich z.B. auch alle durch Absorptionsmessungen mit unterschiedlich polarisierten Photonen bestimmen. Dagegen sind die Parameter zwei-

ter Ordnung nur durch Methoden, bei denen ein weiteres Photon in die Messung involviert ist, bestimmbar, wie z.B. bei Fluoreszenz oder transientser Absorption.

In Abbildung 4-20 ist das Anregungs- und Detektionsschema, das für die Polarisationsexperimente in der Arbeit verwendet wurde, dargestellt. Es entspricht in seinem Aufbau dem klassischen  $90^\circ$ -System, das in Abbildung 2-5 dargestellt ist. Das Laborkoordinaten-System wird mit  $X$ ,  $Y$  und  $Z$  bezeichnet, das Laser-Licht breitet sich hierbei in  $X$ -Richtung aus, roter und blauer Laser-Strahl sind also kollinear.  $H$ ,  $V$ ,  $R$ ,  $L$  bezeichnen die Polarisation (horizontal/vertikal linear, rechts und links zirkular) der Anregungsphotonen. Die Detektoren befinden sich auf der  $Z$ -Achse, wobei der  $x$ -Detektor alle Fluoreszenzphotonen beobachtet, die in Richtung der Ausbreitungsrichtung des Lichtes polarisiert sind; der  $y$ -Detektor detektiert die Photonen, die in Richtung der  $Y$ -Laborachse polarisiert sind.



**Abbildung 4-20** Anregungs- und Detektionsschema für 2C2P-Anisotropiemessungen im  $90^\circ$ -Aufbau,  $X, Y, Z$  Laborachsen;  $H, V, L, R$  Polarisation der Anregungsphotonen;  $x$  und  $y$  Polarisation der Fluoreszenzphotonen relativ zu den Laborachsen.

Wie oben beschrieben, sind die gemessene Fluoreszenzintensität und die totale Fluoreszenzintensität polarisationsabhängig. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten können maximal sieben M-Parameter bestimmt werden, da die 2C2P-Anregung über einen nicht resonanten virtuellen Übergangszustand erfolgt. Das bedeutet, dass ein Set von sieben unabhängigen Polarisationsexperimenten ausreicht, um alle M-Parameter zu bestimmen. Vereinfacht lässt sich die gemessene Fluoreszenzintensität als Summe der Produkte von Polarisationsparametern (Polarisation von Anregungs- und Fluoreszenzphotonen, Ausbreitungsrichtung des Laserlichts, Position der Detektoren) und der oben beschriebenen molekularen M-Parameter darstellen:

$$I_j = \sum_{k=1}^7 g_{jk} M_k \quad (4.18)$$

$I_j$  sind die gemessenen Intensitäten (zum Zeitpunkt der Anregung) bei einer bestimmten Polarisationskombination,  $g_{jk}$  sind hier die einzelnen Elemente einer Polarisationsparametermatrix bzw. Geometriematrix  $g$ , wobei  $j$  die Anzahl der Experimente widerspiegelt. Die  $M_k$  entsprechen den sieben in der Theorie definierten  $M_{K_e}(R, R')$ -Parameter [78], die hier zur Vereinfachung durchnummeriert wurden. Der minimale Wert an unabhängigen Polarisationsexperimenten, um alle M-Parameter zu berechnen, beträgt sieben. In der Praxis sind mehr als sieben Experimente sinnvoll, um Fehler zu minimieren und/oder um Kontrollexperimente durchzuführen.

In Tabelle 4-1 sind die die Elemente der Geometriematrix  $g$  für eine Reihe von Polarisationsexperimenten aufgeführt, wie sie mit dem in Abbildung 4-20 beschriebenen Aufbau durchgeführt werden können. Sie verbindet die M-Parameter und experimentellen Intensitäts-Werte, die bei bestimmter Kombination von Polarisationen der drei Photonen gemessen werden:

**Tabelle 4-1** Tabelle der Elemente der Geometriematrix  $g$  für ein Set von Polarisationsexperimenten (weißer Teil der Tabelle); oberste Zeile: Zuordnung der  $M_k$  zu den entsprechenden  $M_{K_e}(R, R')$ ; erste Spalte links: Zuordnung der Intensitäten  $I_j$  zu einer Kombination von Polarisationen.

$M_k$ $I_j$		$M_1$ $M_0(0,0)$	$M_2$ $M_0(1,1)$	$M_3$ $M_0(2,2)$	$M_4$ $M_2(1,1)$	$M_5$ $M_2(0,2)$	$M_6$ $M_2(1,2)$	$M_7$ $M_2(2,2)$
	$g_{jk}$	1	2	3	4	5	6	7
HHy =	1	$\frac{1}{9}$	0	$\frac{2}{9\sqrt{5}}$	0	$\frac{4}{45}$	0	$\frac{4}{45\sqrt{7}}$
HHx =	2	$\frac{1}{9}$	0	$\frac{2}{9\sqrt{5}}$	0	$-\frac{2}{45}$	0	$-\frac{2}{45\sqrt{7}}$
VVy =	3	$\frac{1}{9}$	0	$\frac{2}{9\sqrt{5}}$	0	$-\frac{2}{45}$	0	$-\frac{2}{45\sqrt{7}}$
VVx =	4	$\frac{1}{9}$	0	$\frac{2}{9\sqrt{5}}$	0	$-\frac{2}{45}$	0	$-\frac{2}{45\sqrt{7}}$
VHy =	5	0	$\frac{\sqrt{3}}{18}$	$\frac{1}{6\sqrt{5}}$	$-\frac{\sqrt{3}}{90}$	0	$-\frac{1}{15}$	$\frac{1}{30\sqrt{7}}$
VHx =	6	0	$\frac{\sqrt{3}}{18}$	$\frac{1}{6\sqrt{5}}$	$\frac{\sqrt{3}}{45}$	0	0	$-\frac{1}{15\sqrt{7}}$
RRy =	7	0	0	$\frac{1}{3\sqrt{5}}$	0	0	0	$\frac{1}{15\sqrt{7}}$
LLy =	8	0	0	$\frac{1}{3\sqrt{5}}$	0	0	0	$\frac{1}{15\sqrt{7}}$
RRx =	9	0	0	$\frac{1}{3\sqrt{5}}$	0	0	0	$-\frac{2}{15\sqrt{7}}$
LLx =	10	0	0	$\frac{1}{3\sqrt{5}}$	0	0	0	$-\frac{2}{15\sqrt{7}}$
RLy =	11	$\frac{1}{9}$	$\frac{\sqrt{3}}{18}$	$\frac{1}{18\sqrt{5}}$	$-\frac{\sqrt{3}}{90}$	$\frac{1}{45}$	0	$-\frac{1}{90\sqrt{7}}$
RLx =	12	$\frac{1}{9}$	$\frac{\sqrt{3}}{18}$	$\frac{1}{18\sqrt{5}}$	$\frac{\sqrt{3}}{45}$	$-\frac{2}{45}$	0	$\frac{1}{45\sqrt{7}}$

Eine vergleichbare Tabelle ist bei Shertin für kollineare Anregung zu finden [78]. Dort werden auch andere Kombinationen der Anregungspolarisation eingesetzt, um die Parameter zu ermitteln. Der Intensitätswert der Fluoreszenz zum Zeitpunkt der Anregung, der bei **zwei horizontal (HH)** polarisierten Anregungsphotonen auf Detektor **y** gemessen wird, wird **HHy** genannt. Als Beschreibung für  $I_1 = \text{HHy}$  ergibt sich dann also mit Tabelle 4-1:

$$\begin{aligned} \text{HHy} = I_1 = & \frac{1}{9} M_0(0,0) + 0 \cdot M_0(1,1) + \frac{2}{9\sqrt{5}} M_0(2,2) + 0 \cdot M_2(1,1) \\ & + \frac{4}{45} M_2(0,2) + 0 \cdot M_2(1,2) + \frac{4}{45\sqrt{7}} M_2(2,2) \end{aligned} \quad (4.19)$$

Mathematisch betrachtet ergeben sich die M-Parameter dann bei bekannten/gemessenen  $I$  über einfaches Auflösen von Linearkombinationen. In untenstehender Tabelle sind diese Linearkombinationen aufgeführt. Zusätzlich werden in der Tabelle die einfachen Beziehungen zwischen Größen wie  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$ , wie man sie aus herkömmlichen Fluoreszenzanisotropiemessungen (s. Abschnitt 2.4.1) kennt, und den Linearkombinationen hergestellt.

**Tabelle 4-2 Linearkombinationen der  $I_j$  aus Tabelle 4-1.**

Linearkombination	Analogon bei der Fluoreszenzanisotropie	
$\text{HHy} + 2\text{HHx} = C \left( \frac{1}{3} M_0(0,0) + \frac{2}{3\sqrt{5}} M_0(2,2) \right)$	$I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ bei linear Pol. H Totale Intensität bei parallelen Photonen, $I_{\text{lin par}}$	(4.20)
$\text{HHy} - \text{HHx} = C \left( \frac{2}{15} M_2(0,2) + \frac{2}{15\sqrt{7}} M_2(2,2) \right)$	$I_{\parallel} - I_{\perp}$ bei linear Pol. H	(4.21)
$\text{VHx} + 2\text{VHy} = C \left( \frac{\sqrt{3}}{6} M_0(1,1) + \frac{1}{2\sqrt{5}} M_0(2,2) - \frac{2}{15} M_2(1,2) \right)$	Keine Entsprechung, da $\text{VHx} + 2\text{VHy}$ nicht totale Intensität, Anisotropie bei anderer Berechnung der totalen Intensität	(4.22)
$\text{VHy} - \text{VHx} = C \left( -\frac{\sqrt{3}}{30} M_2(1,1) - \frac{1}{15} M_2(1,2) + \frac{1}{10\sqrt{7}} M_2(2,2) \right)$	Anisotroper Teil für gekreuzte Anregung	(4.23)

$RRx + 2RRy = C \left( \frac{1}{\sqrt{5}} M_0(2,2) \right)$	$I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ bei zirkular gleichsinniger Pol. Totale Intensität bei zirk. gleichs. Photonen $I_{\text{circ.co}}$	(4.24)
$RRx - 2RRy = C \left( -\frac{1}{5\sqrt{7}} M_2(2,2) \right)$	$I_{\parallel} - I_{\perp}$ bei zirkular gleichsinniger Pol.	(4.25)
$RLx + 2RLy = C \left( \frac{1}{3} M_0(0,0) + \frac{\sqrt{3}}{6} M_0(1,1) + \frac{1}{6\sqrt{5}} M_0(2,2) \right)$	$I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ bei zirkular gleichsinniger Pol. H Totale Intensität bei zirk. gegensinn. Photonen, $I_{\text{circ.con}}$	(4.26)
$RLx - 2RLy = C \left( \frac{\sqrt{3}}{30} M_2(1,1) - \frac{1}{15} M_2(0,2) + \frac{1}{30\sqrt{7}} M_2(2,2) \right)$	$I_{\parallel} - I_{\perp}$ bei zirkular gegensinniger Pol.	(4.27)

### *Verknüpfung von experimentellen Messdaten und theoretischer Beschreibung*

Die experimentellen Intensitätsdaten sind multiexponentielle Fluoreszenzabklingkurven, wie sie typischerweise bei zeitabhängigen Fluoreszenzanisotropiemessungen auftreten (siehe oben). Sie ergeben sich durch das gleichzeitige Auftreten von zwei Prozessen: Der Entvölkerung des angeregten Zustandes (Fluoreszenz) und der Depolarisation der Fluoreszenz durch rotationsbedingte Diffusion.

Das Abklingverhalten von Fluoreszenz wird meistens durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschrieben. PTP und andere Fluorophore haben ein monoexponentielles Abklingverhalten, dies weist auf die Existenz eines einzigen angeregten Zustands bzw. das Vorhandensein einer einzigen Konformation des Moleküls hin.

Wie oben beschrieben können die M-Parameter in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die Parameter nullter Ordnung ( $M_0(R, R')$ ) gehören zu dem isotropen Anteil des Signals, d.h. dem Abklingen der Fluoreszenz. Die Parameter zweiter Ordnung ( $M_2(R, R')$ ) lassen sich dem anisotropen Anteil des Signals zuordnen, d.h. der Anisotropie der Fluoreszenz. Die Anisotropie der Fluoreszenz ist bei beweglichen Molekülen in Lösung eine zeitabhängige Größe und lässt sich vereinfacht mit drei Zeitkonstanten beschreiben. Wie man aus den obigen Tabellen entnehmen kann, ist jedes Signal  $I_j$  eine Funktion beider Arten von Parametern. Für die Zeit-

abhängigkeit von  $I_j$  lässt sich dann bei einer Fluoreszenzlebensdauer und einer Rotationskorrelationszeit vereinfacht schreiben:

$$I(t) = F \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) \left[ \sum G_0 M_0(R, R') + \sum G_2 M_2(R, R') \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{rot}}\right) \right] \quad (4.28)$$

$F \cdot \exp(-t/\tau_f)$  beschreibt die Entvölkerung des angeregten Zustandes und ist proportional zur Anregungsleistung, Quantenausbeute und Detektionseffizienz. Der Vorfaktor  $F$  kann daher bei einem Set von Messungen als Konstante gesehen werden.  $G_0$  und  $G_2$  sind hier die entsprechenden Geometrieparameter, die den isotropen und anisotropen Parameter zugeordnet werden. Sie können aus Tabelle 4-1 entnommen werden.  $I(t)$  ist daher bei einer Rotationszeit und einer Fluoreszenzlebensdauer eine biexponentielle Funktion.

Um Aussagen über die Orientierung des Emissionsdipolmoments treffen zu können, ist es Ziel einer Auswertung, die M-Parameter zum Zeitpunkt  $t=0$ , d.h. direkt nach der Anregung - ohne dass signifikante Molekülrotation stattgefunden haben könnte - zu bestimmen. Das Größenverhältnis der isotropen Parameter bleibt jedoch zeitlich konstant, es lässt sich daher wie erwähnt auch bei nicht zeitaufgelösten Messungen bestimmen. Für die anisotropen Parameter gilt bei Rotationsdiffusion in Lösemitteln, dass sie bei langen Zeiten nicht mehr messbar sind. Sie geben die Projektion der Fluoreszenzdipolmomente auf die Tensorachsen wieder. Bei langen Zeiten sind alle Dipolmomente zufällig verteilt und die Anisotropie ist gleich null.

Die Parameter ergeben sich die durch Lösen eines überbestimmten linearen Gleichungssystems mit sieben Unbekannten (den M-Parametern). Die Geometrie-Parameter stellen die hier Koeffizientenmatrix dar und die  $I_j$ -Werte stellen die Ergebnisvektoren dar.

Es gibt mehrere Möglichkeiten die Parameter zum Zeitpunkt  $t=0$  auszurechnen. Eine Möglichkeit ist das direkte Verrechnen der Rohdaten miteinander, was jedoch voraussetzt, dass die Empfindlichkeit der Detektoren identisch ist und  $t=0$  für beiden Detektoren gleich ist. Eine Korrektur ist zeitaufwändig und funktioniert nicht optimal. Ebenso lässt sich der Zeitpunkt  $t=0$  aufgrund der IRF nicht exakt bestimmt, da sich bei TCSPC-Messungen ohne eine Fitting-Prozedur kein präziser Wert für  $t=0$  angeben lässt.

Für die Auswertung wurde daher unter Benutzung eines Matlab-Programms nach der Methode des „reconvolutional Fitting“ (Einbeziehung der IRF) Fitfunktionen an die Daten der einzelnen Kanäle  $x$  und  $y$  angepasst.



Die M-Parameter lassen sich im Prinzip direkt durch globales gemeinsames Fitten aller sieben (oder mehr) Intensitätsdaten (HHy, HHx, R Ry usw.) ermitteln. Alle Intensitätsdaten lassen sich mit einer Summe von Exponentialfunktion wie Gleichung 4.28 beschreiben. Über Parameter-Sharing (gleicher Wert der M-Parameter, gleiche Lebensdauern/Rotationszeiten für alle Intensitätsdaten) und setzen bestimmter Grenzen lassen sie sich ermitteln. Ein Nachteil dieser Auswertung ist, dass man für eine komplette Auswertung die gleiche Empfindlichkeit bei allen Kanälen (den beiden Detektoren) haben muss. Zum anderen ist die programmiertechnische Implementierung sehr aufwändig.

Es wurde deshalb ein anderer Weg gewählt, indem die Äquivalenz der zeitabhängigen Gleichung von 4.28 für die M-Parameter und der Gleichungen für die Anisotropiekanäle  $I_{\parallel}$  (4.15) und  $I_{\perp}$  (4.16) genutzt wurde. Mit der Methode des globalen Fitting (Parameter-Sharing etc.) wurde jeweils  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  gemeinsam für eine Polarisationskombination (HH, RR etc.) gefittet. Die Lebensdauer und Rotationskorrelationszeit sind dabei identisch für alle Polarisationskombinationen (globale Parameter). Dabei wird der Einfluss der IRF mit einbezogen, die unterschiedliche Sensitivität und zeitliche Verschiebung der Detektorsignale wird in der Fit-Funktion berücksichtigt. Die Vorteile eines solchen Verfahrens sind in der Literatur vielfach belegt [113–116]. Aufgrund der Messmethode (TCSPC) werden die Intensitätsdaten gemäß Poisson-Statistik mit der Wurzel der Intensitäten gewichtet und die Güte des Fits über visuelle Inspektion, die reduzierten Residuen (symmetrische Schwankungen um Null) und die Größe des  $\chi^2_R$ -Parameters (ca. Eins bei Überstimmung von Fit und Daten) bestimmt (s. auch [60]).

Im Falle zirkular gleichsinniger Anregung (RRx und R Ry) bedeutet dies bei einer Fluoreszenzlebensdauer und einer Rotationskorrelationszeit:

$$RRx(t) = I_{\parallel}(t) = \frac{1}{3}A_{\parallel} \exp\left[-\frac{t}{\tau_f}\right] \cdot \left[1 + 2 \cdot r \cdot \exp\left[-\frac{t}{\tau_{rot}}\right]\right] \quad (4.29)$$

$$RRy(t) = I_{\perp}(t) = \frac{1}{3}A_{\perp} \exp\left[-\frac{t}{\tau_f}\right] \cdot \left[1 - r \cdot \exp\left[-\frac{t}{\tau_{rot}}\right]\right] \quad (4.30)$$

$A_{\parallel}$  und  $A_{\perp}$  entsprechen der totalen Fluoreszenzintensität bei Anregung mit RR, sie sind bei gleicher Empfindlichkeit der Detektoren identisch. Da dies nicht immer der Fall ist, ist der Parameter variabel. Weiterer Fitparameter ist neben den Zeiten  $\tau_f$  und  $\tau_{rot}$  die Anfangsanisotropie  $r(0)$ . Pro Polarisationskombination (HH, RR, RL, VH) gibt es jeweils eine unterschiedliche Anisotropie. Sie beschreibt hierbei die Summe der anisotropen M-Parameter. RRx(0) entspricht dann beispielsweise der Summe:  $1/3(A_{\parallel} + 2 A_{\parallel}r)$ , R Ry(0) entspricht  $1/3(A_{\perp} - r A_{\perp})$ .

Für senkrechte Anregungspolarisationen (VHx und VHy) lässt sich dieses Modell nicht anwenden, da  $VHx + 2VHy$  nicht der totalen Fluoreszenzintensität entspricht. Bei einer  $90^\circ$ -Geometrie lässt sich sie auf diese Weise nicht berechnen. VHx und VHy wurden deshalb mit einer biexponentiellen Funktion unter Berücksichtigung der IRF gefittet, um die Vorfaktoren und die Intensität bei  $t=0$  zu ermitteln. Globales Fitting lässt sich hier nur anwenden, wenn  $r(0)$  nicht in das Parameter-Sharing mit einbezogen wird, was bei dem verwendeten Fit-Programm nicht möglich war. Die „reale“ Anisotropie ( $r_{per}$ ) lässt sich im Nachhinein dennoch angeben, da man die totale Intensität für senkrecht polarisierte Photonen auf eine andere

Weise berechnen kann:  $(I_{lin\ per} = \frac{c}{9} \cdot \left[ \frac{\sqrt{3}}{2} M_0(1,1) + \frac{3}{2\sqrt{5}} M_0(2,2) \right])$ .

Nach Fitten eines kompletten Datensets (HHx, HHy; RRx, R Ry; RLx, RLy; VHx, VHy) erhält man so vier verschiedene Vorfaktoren  $A$ , die die totalen Intensitäten (Summen der isotropen M-Parameter) darstellen und fünf verschiedene Anisotropien  $r$ , die die jeweiligen Summen der anisotropen M-Parameter repräsentieren. Hat man so alle Intensitäten für  $t=0$  erhalten, lassen sich die M-Parameter über das Lösen eines Gleichungssystem mit sieben Unbekannten bestimmen.

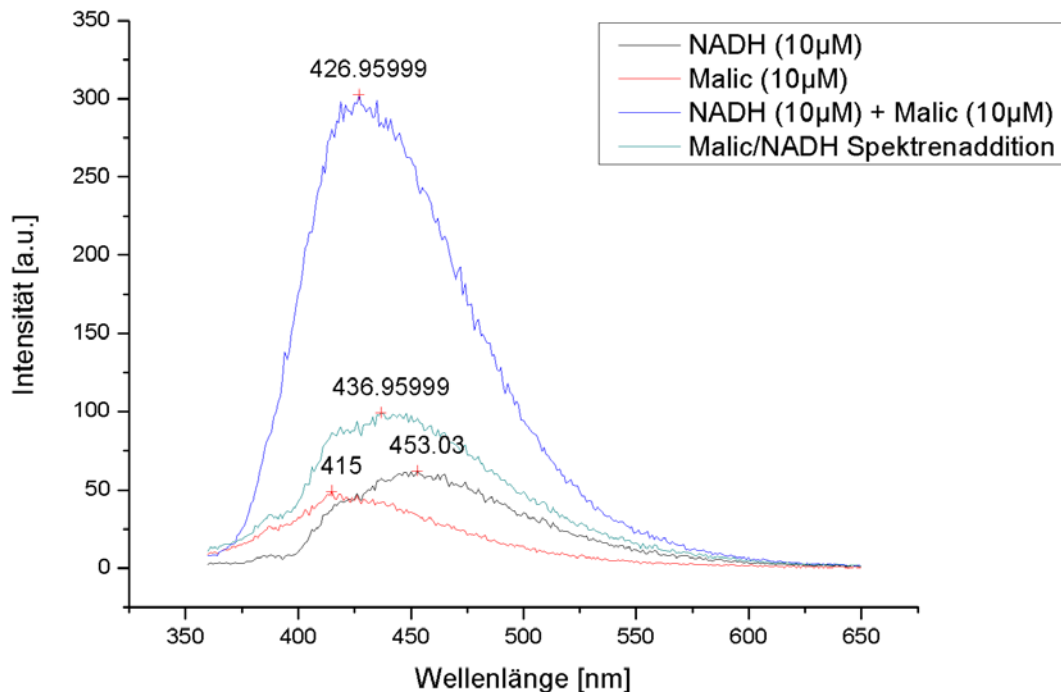
## 5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 5.1 NAD(P)H-Messungen

Der Schwerpunkt der Autofluoreszenzmessungen in biologischen Proben lag auf der Untersuchung der Emission von NAD(P)H bei verschiedenen physiologischen Bedingungen. Um etwaige Einflüsse von FAD auszuschließen, wurden entsprechende Emissionsfilter benutzt (460-80 nm) und eine Anregungswellenlänge von 780 nm verwendet. Bei dieser Wellenlänge ist der Absorptionsquerschnitt von FAD geringer als der von NAD(P)H [31]. Das Zweiphotonenabsorptionsmaximum von NAD(P)H liegt bei 700 nm, jedoch wurde in Vorversuchen die höchste Fluoreszenzintensität in NADH-Lösungen bei 780 nm gemessen. Dies ist durch die Leistungskurve des verwendeten Titan:Saphir Lasers begründet, die bei dieser Wellenlänge ihr Maximum hat.

Im Rahmen der Arbeit wurden einige Vorversuche mit NADH und bekannten Proteinen durchgeführt. Wenn man Malat-Dehydrogenase (hier kurz Malic genannt) und NADH im Verhältnis 1:1 mischt erhöht sich die Fluoreszenzintensität um ein vielfaches mehr als man durch einfache Addition der Einzelspektren erwarten würde (siehe Abbildung 5-1). Dies ist auf die Bindung von NADH an das Enzym zurückzuführen. Dabei ändert sich die Quantenausbeute von NADH, die Fluoreszenzintensität ist daher höher [15,85]. Eine Blauverschiebung des Emissionsspektrums entspricht den Erwartungen [60]. Die Kinetik dieser Enzymreaktion wurde kürzlich mit einem Streak-Kamera-System untersucht [117]. Dort kommt es zuerst zu einer starken Erhöhung der Lebensdauer aufgrund der Bindung an das Protein und anschließend zu einem Abfall auf eine Lebensdauer, die immer noch deutlich über der des freien NADH liegt. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Formen von

NADH (frei/gebunden) ein, deren Verhältnis durch die Affinität des Enzyms zu NADH bestimmt wird.



**Abbildung 5-1** Emissionsspektren von NADH, Malat-Dehydrogenase (Malic) , einer 1:1 Mischung von NADH und Malic bei Anregung mit 340 nm

Diese und andere Beobachtungen sind u.a. der Grund für die Annahme, dass man Redoxstatus/die metabolische Aktivität der Zelle anhand des Verhältnisses vom freien zu gebundenen NAD(P)H zu beobachten.

Hierbei erlaubt es nur FLIM einen Blick auf das Verhältnis von freien zu gebundenen NADH zu werfen. Blockt man z.B. mit Inhibitoren wie Cyaniden die Zellatmung, akkumuliert sich NADH in den Mitochondrien, welches nicht mehr oxidiert werden kann. Der Anteil an freiem NADH steigt dementsprechend, was sich durch biexponentielle Fluoreszenzlebensdauermessungen bestätigen lässt [118].

In Abbildung 5-2 ist der Verlauf von Stimulierungsmessungen an Pankreasinseln dargestellt. Diese Messungen wurden in der AG Rustenbeck, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU Braunschweig durchgeführt. Die Inseln der Pankreas werden einen Zeitlang mit Krebs-Ringer-Medium ohne Glucose umspült, ab einem bestimmten Zeitpunkt wird das Medium auf Glucose haltiges Medium gewechselt. Nach einer zeitlichen Verzögerung kommt es zu einem Anstieg der Autofluoreszenz, nach ca. 5-10 min bleibt die Intensität der Autofluoreszenz kon-

stant, sie liegt jedoch ca. 30-40 % über dem Wert vor der Stimulation. Wird die Glucosekonzentration wieder erniedrigt, sinkt der Wert der Autofluoreszenz (hier nicht dargestellt) mit einer Zeitverzögerung. Die Intensität der Erhöhung hängt auch von der Temperatur des umgebenden Mediums ab. Bei niedriger Temperatur als 37°C ist die Steigerung der Intensität ausgeprägter [96]. Ähnliche Steigerungen der Intensität wurden auch von Luciani gemessen [89].

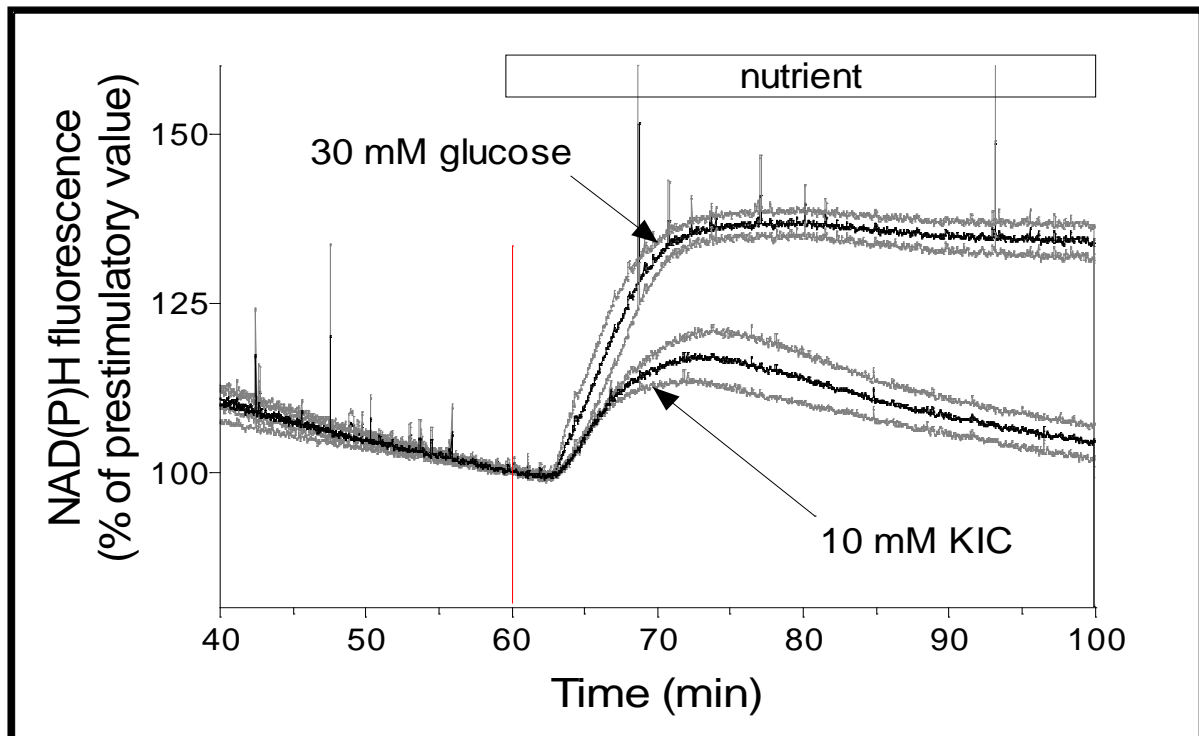


Abbildung 5-2 Beispielverlauf von Stimulierungsmessung an Inseln, Stimulierung mit Glucose und KIC (Quelle AG Rustenbeck, TU Braunschweig)

In der AG Gericke wurden im Rahmen dieser Arbeit nun die gleichen Stimulierungsexperimente am Zweiphotonenmikroskop in Kombination mit FLIM durchgeführt.

### 5.1.1 Stimulierungsmessungen mit Glucose

#### *MIN6-Zellen*

Zunächst wurden MIN6-Zellen als Modellsystem für erste Autofluoreszenzmessungen verwendet, da die Herstellung von Pankreasinseln aufwändig und kostenintensiv ist. MIN6-Zellen lassen sich hingegen kultivieren, so dass nahezu jederzeit eine Vielzahl an Zellen zum Experiment bereit ist. Dadurch konnte das Lasersystem, das Perfusionssystem und die Auswertung getestet werden.

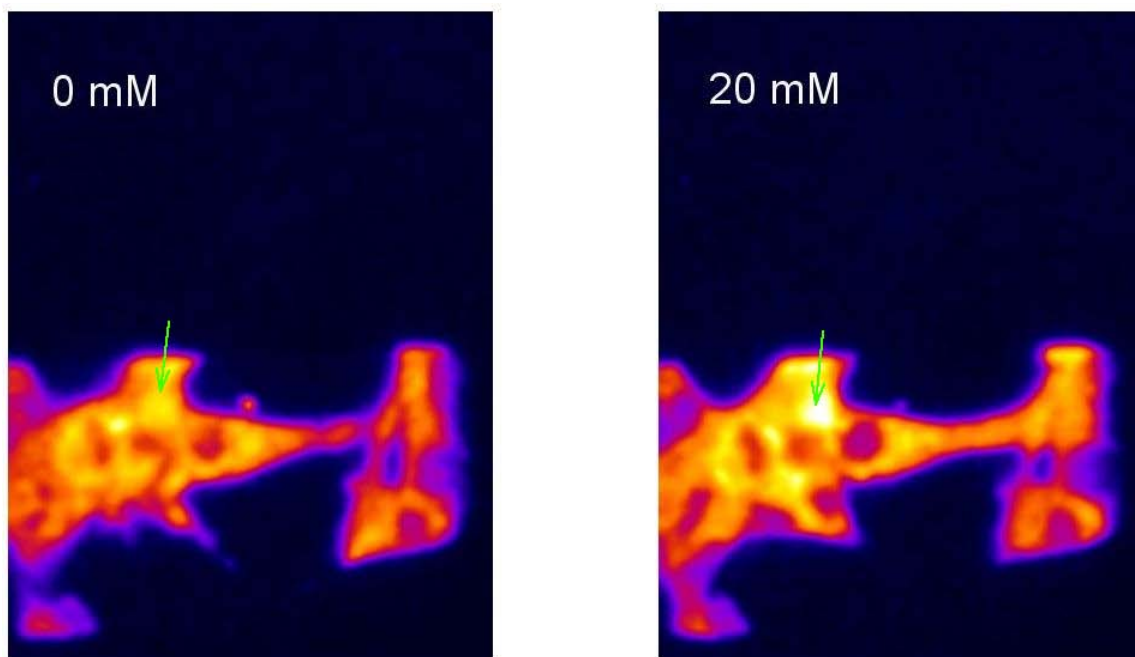


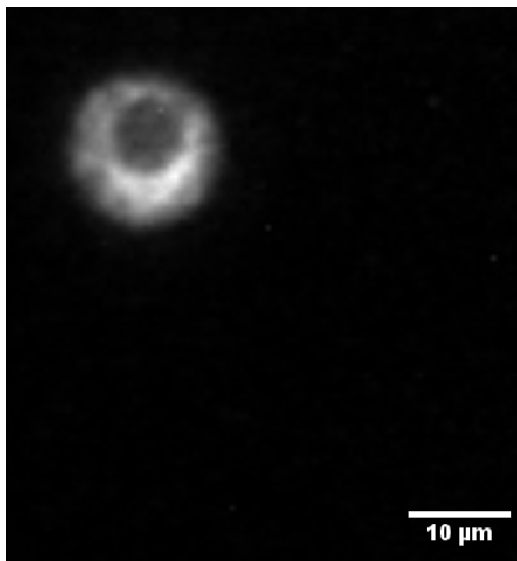
Abbildung 5-3 Falschfarbenintensitätsdarstellung eines Stimulationsexperimentes mit Glucose an MIN6-Zellen

In obiger Abbildung ist die Erhöhung der Autofluoreszenz bei Gabe von Medium mit Glucose gut zu sehen. Im linken Bild liegt die Konzentration bei 0 mmol/L. Wird die Konzentration auf 20 mmol/L erhöht, steigt die Autofluoreszenz an. An der mit dem Pfeil markierten Stelle steigt die Intensität um 28 % an.

#### *Isolierte $\beta$ -Zellen aus der Pankreas*

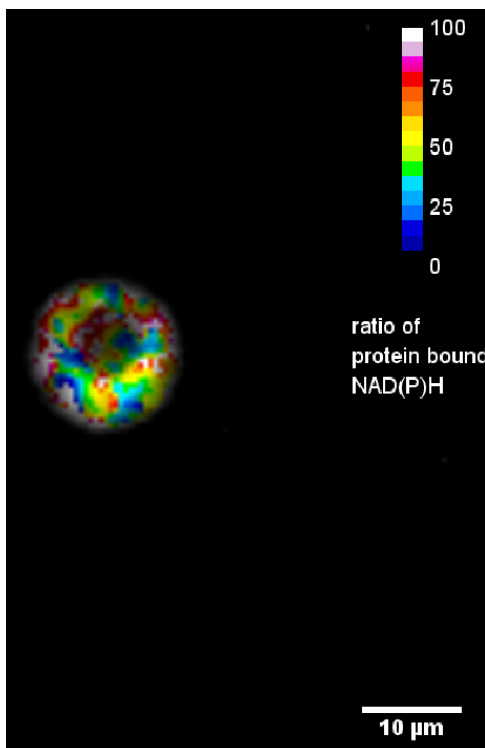
Nach den Messungen an MIN6-Zellen wurden Messungen an einzelnen  $\beta$ -Zellen aus Langerhans'schen Inseln aus der Maus begonnen. Diese Zellen entstammen direkt aus lebendem Gewebe und sind nicht wie die MIN6-Zellen in Zellkultur entstanden. Sie reagieren z.B. spezifischer auf bestimmte Stimulationen als Zellen aus Kulturen und bieten daher einen guten Abgleich zu *in vivo* Messungen in ganzen Inseln. Zusätzlich kann hier im Gegensatz zu den Messungen an ganzen Pankreasinseln die Verteilung von NAD(P)H subzellulär untersucht werden.

In Abbildung 5-4 ist ein Intensitätsbild einer isolierten Pankreas  $\beta$ -Zelle zu sehen. Sie sind



deutlich kleiner als MIN6-Zellen und bilden keine Ausläufer. In der Mitte der Zelle ist der Kern deutlich als Region mit wenig Fluoreszenz zu erkennen. Zellkerne lassen sich in Autofluoreszenzbildern gut lokalisieren, da dort die NADH-Konzentration kleiner ist als im Zytoplasma/Mitochondrien. Aufgrund der Verschlechterung der Auflösung durch die MCP lassen sich keine granulären Strukturen nachweisen, die man Mitochondrien zuordnen könnte.

Abbildung 5-4 Intensitätsbild einer isolierten  $\beta$ -Zelle aus dem Pankreas



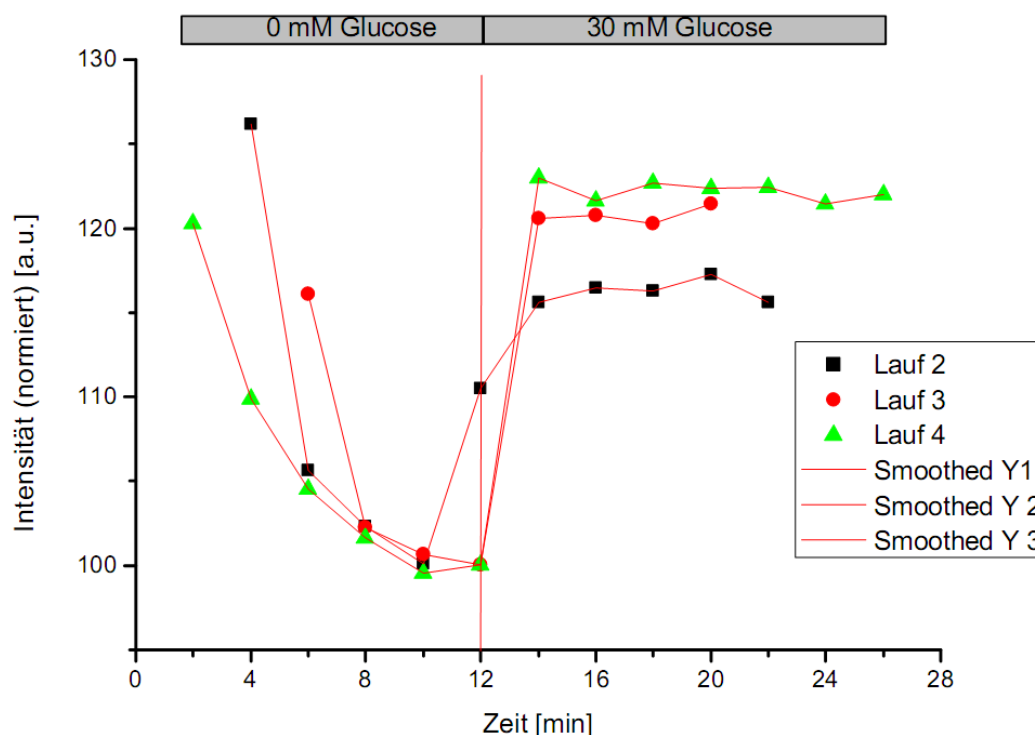
In Abbildung 5-5 ist ein FLIM-Bild der gleichen Zelle wie in obiger Abbildung zu sehen. Es wird der Anteil an Protein gebundenen NADH (ratio) gezeigt. Es gibt Regionen mit einem erhöhten Anteil. Sie lassen jedoch nicht direkt mit den Zellstrukturen korrelieren. Im Mittel liegen ca. 50 % des NAD(P)H gebunden vor.

Abbildung 5-5 Verteilung des Anteils an gebundenem NAD(P)H in einer isolierten  $\beta$ -Zelle aus dem Pankreas

In gleicher Weise wie oben beschrieben, wurde an den isolierten Pankreaszellen Stimulierungsmessungen mit 30 mM Glucose durchgeführt. Während der Umspülung mit Glucose freiem oder Glucose haltigen Medium wurden kontinuierlich FLIM-Messungen durchgeführt. Die experimentellen Parameter (Belichtungszeit, Delay, Anzahl der Datenpunkte) wurden

dabei konstant gehalten. Aus den FLIM-Daten wurde durch Summation der einzelnen Intensitätsbilder pro Zeitpunkt (siehe Abbildung 4-1) ein Bild der integralen Intensität erzeugt.

In Abbildung 5-6 ist der Verlauf der integralen Intensität von drei Stimulierungsmessung zu sehen. Da die Dauer in FLIM-Messung hier ca. zwei Minuten betrug, gibt es alle zwei Minuten einen Datenpunkt für die Intensität. Ein Vergleich zwischen Abbildung 5-2 und Abbildung 5-6 macht deutlich, dass eine Stimulierung in allen Fällen stattgefunden hat, der Anstieg der Autofluoreszenz bewegt sich in einem ähnlichem Rahmen. Vor der Stimulierung ist bei beiden Abbildungen ein deutlicher Abfall der Intensität zu sehen. Dies ist vermutlich auf Photobleichung zurückzuführen.



**Abbildung 5-6 Intensitätsverlauf von drei Stimulierungsmessungen mit 30 mM Glucose an isolierten  $\beta$ -Zellen aus dem Pankreas, die Intensität wurde auf den letzten Wert vor der Stimulation normiert**

Die Intensitätsdaten zeigen, dass die Stimulierung als solche erfolgreich war. Die Auswertung der FLIM-Daten in Abbildung 5-7 zeigt, dass es keine signifikante Änderung im Verhältnis von gebundenen zu freiem NAD(P)H gibt (keine Änderung im Verhältnis der Vorfaktoren). Es liegen ca. 45 % des NAD(P)H in gebundener Form vor. Die Photobleichung hat ebenfalls keinen Effekt auf das Verhältnis. Dies lässt darauf schließen, dass im Mittel bei Stimulation einer  $\beta$ -Zelle mit Glucose zu einer einfachen Erhöhung der Konzentration von NAD(P)H kommt.



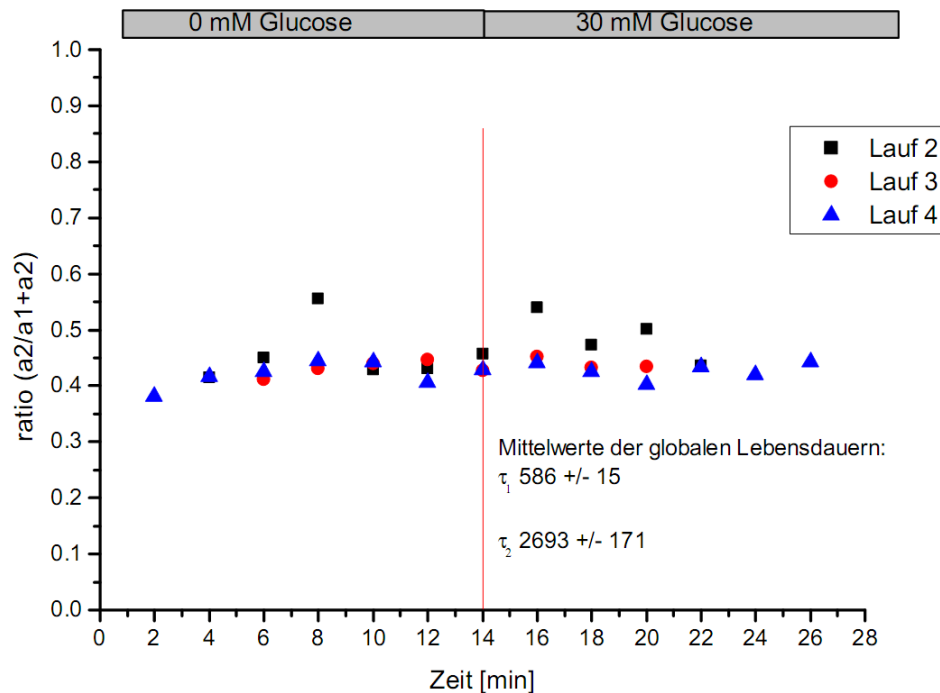


Abbildung 5-7 Verhältnis (ratio) von gebundenen/zu ungebundenem NAD(P)H, globale Auswertung bei drei Stimulierungsmessungen

Während bei der obigen Auswertung über die gesamte Zelle gemittelt wurde (globale Auswertung), wurde bei den folgenden Abbildungen (Abbildung 5-8 bis Abbildung 5-11) eine Auswertung pro Pixel durchgeführt. In Abbildung 5-8 sind Lebensdauerbilder zu sehen, die man nach einer solchen Auswertung erhält. Ein Histogramm (Abbildung 5-9) über beide Lebensdauerbilder zeigt, die Häufigkeit der Lebensdauer über die Zelle, auf die ein Peakfit angewendet wurde. Die Peakwerte entsprechen liegen im Bereich der erwarteten Werte für freies und gebundenes NAD(P)H. Einige kleine Bereiche der Zellen weisen sehr hohe Lebensdauern auf (sowohl frei als auch gebunden). Dies könnte auf Auswertungsartefakte zurückzuführen sein. Auf subzellulärer Ebene konnte jedoch keine Änderung des Verhältnisses der Vorfaktoren oder der Lebensdauern festgestellt werden. Es sind räumlichen Veränderungen von Bild zu Bild zu sehen, jedoch tritt keine signifikante Veränderung bei Stimulierung auf. Die Verteilungen der Lebensdauern sind relativ breit, alle Bilder zeigen eine starke Heterogenität. Dies spiegelt die Bindung von NADH an viele unterschiedliche Proteine wider und die vereinfachte Betrachtung der Fluoreszenzabklingkurven von zellulären NAD(P)H als biexponentielle Funktion. Eine triexponentieller Fit führte hier zu keinem Ergebnis, da die Anzahl an Datenpunkte zu gering ist.

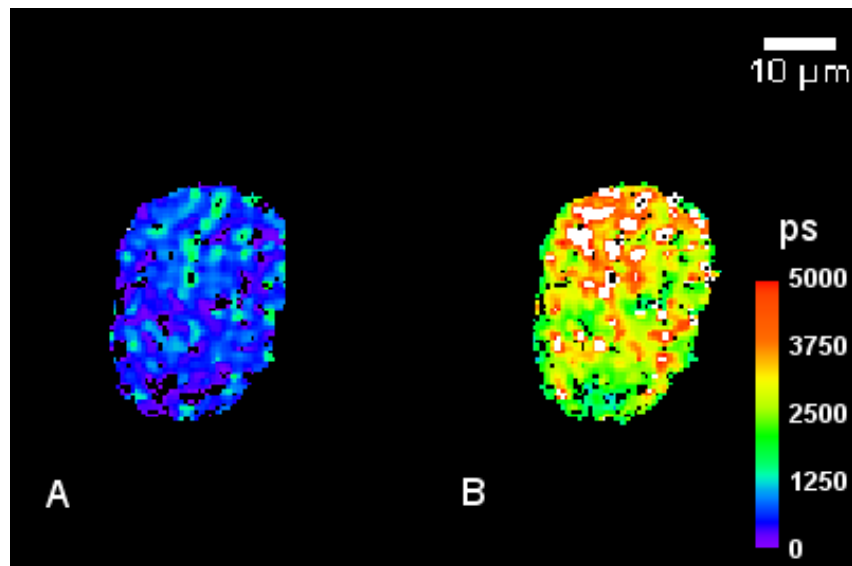


Abbildung 5-8 A Lebensdauerbild freies NAD(P)H und B Lebensdauerbild gebundenes NAD(P)H

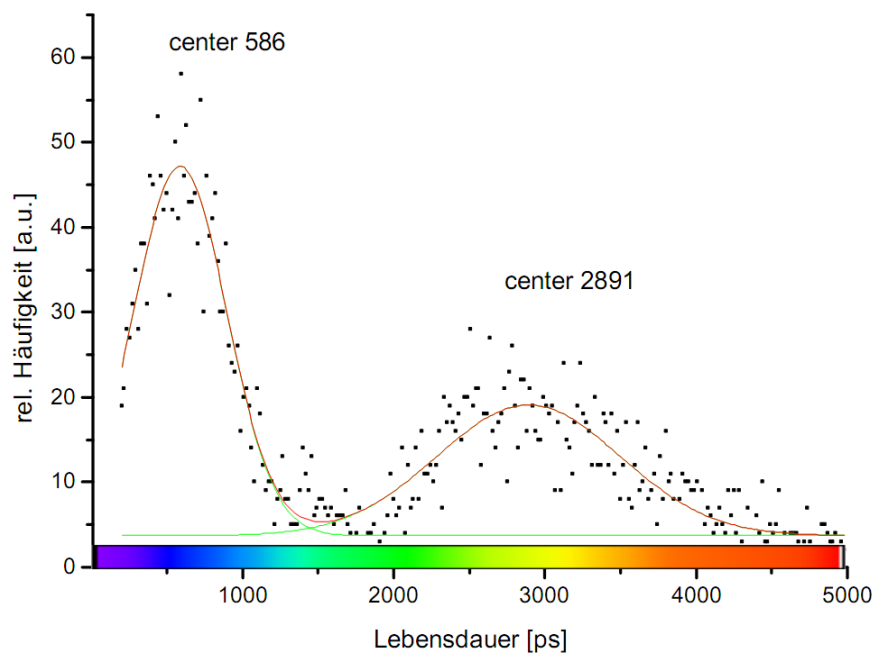


Abbildung 5-9 schwarz: Histogramme über Lebensdauerbilder von Abbildung 5-8, rote Kurve Peakfit auf die Histogramm-Daten angewendet

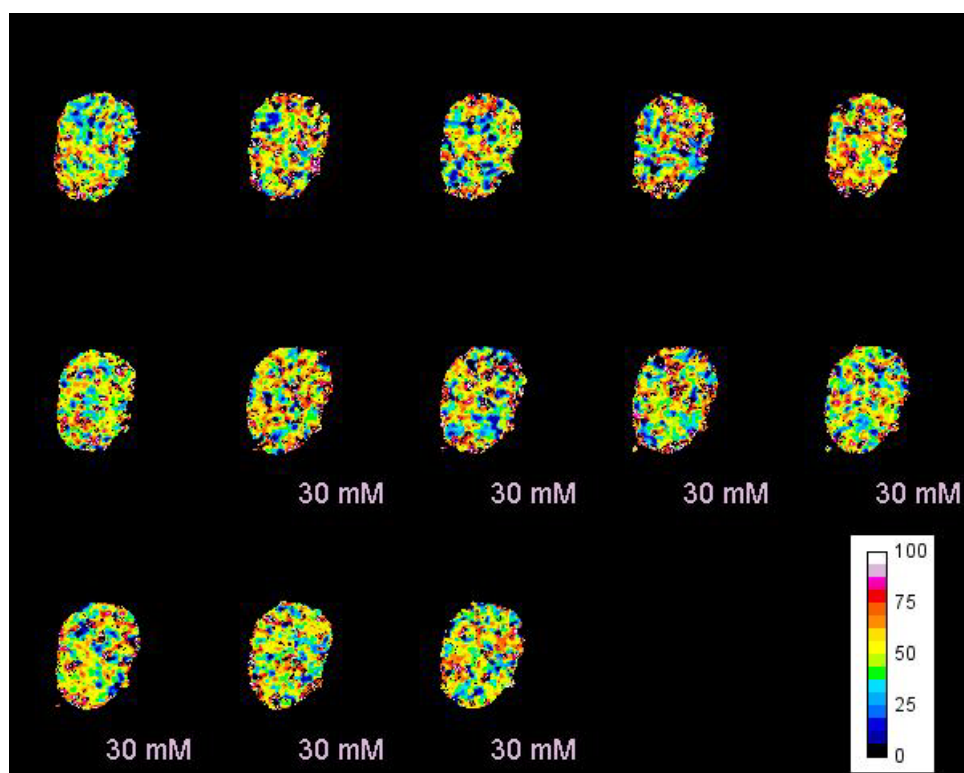


Abbildung 5-10 Verteilung des gebundenen NAD(P)H (ratio ( $a_2/a_1+a_2$ )) einer Stimulationsmessung (Lauf 4), Prozentangaben

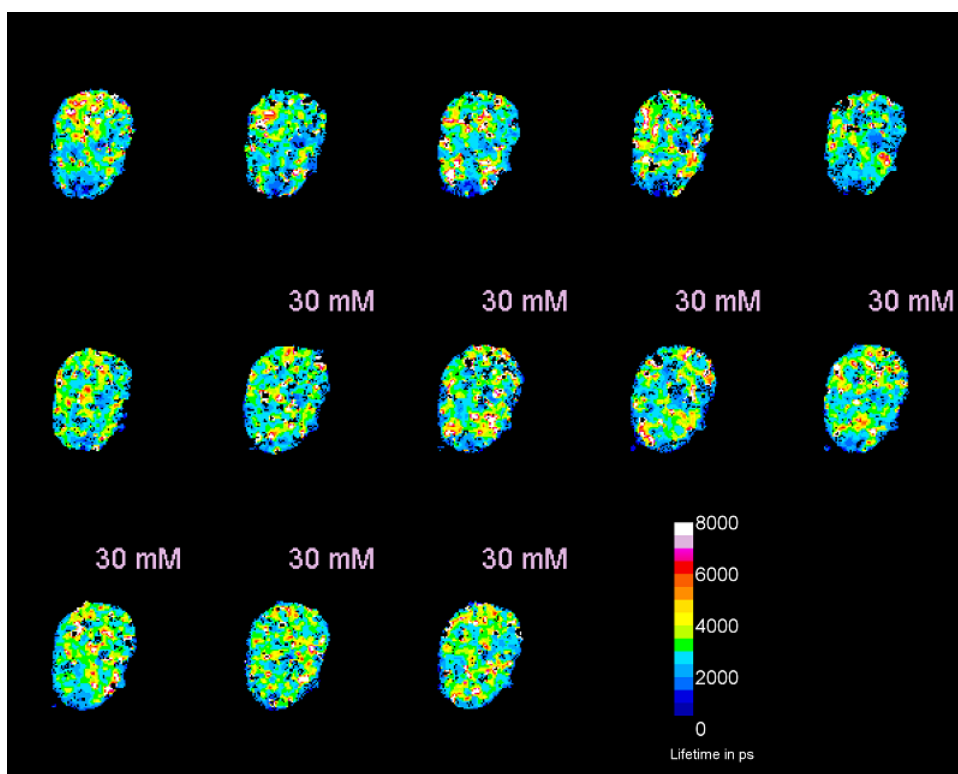


Abbildung 5-11 Lebensdauerbilder ( $\tau_2$ , gebundenes NAD(P)H) einer Stimulationsmessung (Lauf 4)

### Messungen an Langerhanns'schen Inseln

Nach den Messungen an MIN6-Zellen und isolierten Einzelzellen wurden Messungen an Langerhanns'schen Inseln (hier auch kurz Pankreasinseln genannt) aus der Maus durchgeführt. Diese Inseln entstammen direkt lebendem Gewebe und bieten einen Überblick darüber, wie  $\beta$ -Zellen im Verbund bei Stimulierung reagieren. Sie reagieren z.B. spezifischer auf bestimmte Stimulationen als Zellen aus Kulturen und bieten daher einen guten Abgleich zu *in vivo* Messungen in der Maus.

Zunächst wurden reine Intensitätsmessungen durchgeführt, um die Stimulationsfähigkeit der Inseln zu testen. In Abbildung 5-12 ist der Verlauf einer solchen Messung dargestellt. Der Verlauf entspricht der in Abbildung 5-2, d.h. die Stimulation war gelungen.

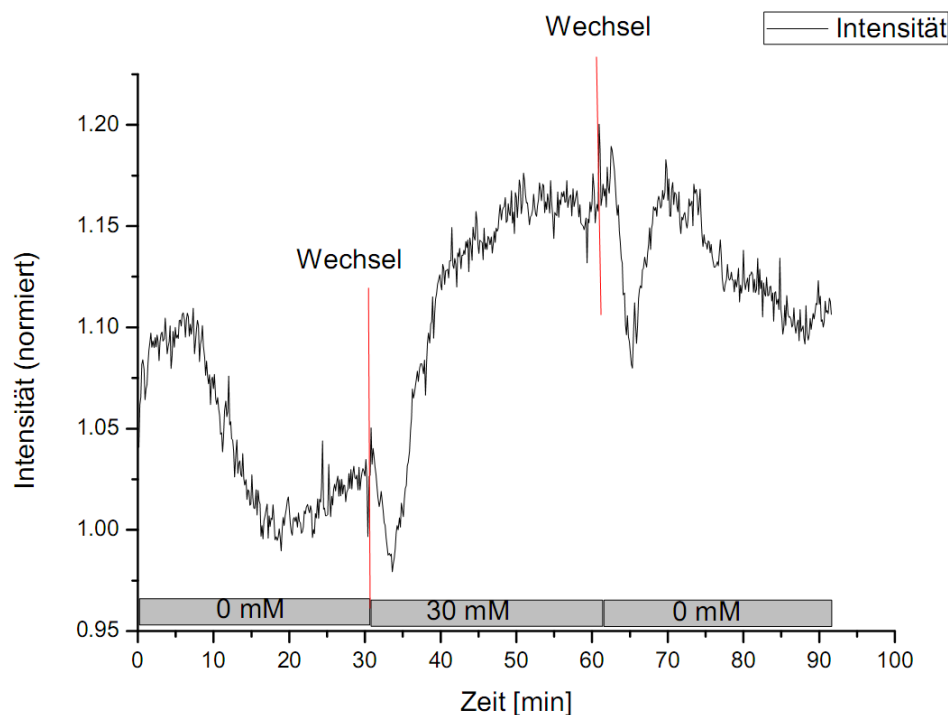


Abbildung 5-12 Verlauf einer reinen Intensitätsmessung an einer Pankreasinsel

Die Vorgehensweise für Stimulationsmessungen bei denen gleichzeitig Intensität und Lebensdauer aufgenommen wurde, war die gleiche wie bei den isolierten Zellen. Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse einer Stimulationsmessung an einer Pankreasinsel dargestellt. In Abbildung 5-13 ist eine Reihe von integralen Intensitätsbildern einer Pankreasinsel dargestellt, die im Verlauf einer Stimulationsmessung aufgenommen wurden. Diese Bilder sind ein 2D-Ausschnitt (2D-Scheibe) aus der Mitte einer am Deckgläschen angewachsenen Pankreasinsel, die in Wirklichkeit ein 3D-Objekt mit einem Durchmesser von ca. 150  $\mu\text{m}$  darstellt. Mit dem verwendeten Zweiphotonenmikroskop kann ein beliebiger 2D-Ausschnitt

dieser Insel zur FLIM-Messung ausgewählt werden und nach einer Reihe von Messungen prinzipiell ein 3D-FLIM-Bild erzeugt werden. Mit herkömmlichen Methoden ist dies dagegen nicht ohne weiteres möglich. In den Bildern sind die Kerne der einzelnen Zellen deutlich erkennbar und bei Glucose-Stimulierung erhöht sich die Autofluoreszenz deutlich. Abbildung 6-14 bis 6-16 stellen die Ergebnisse einer FLIM-Messung dar: Die Verteilung der Lebensdauern und das Verhältnis der Vorfaktoren. Die räumliche Verteilung der Parameter ist relativ homogen. Einige Bereiche weisen erhöhte Fluoreszenzlebensdauern auf, es konnte jedoch keine direkte Korrelation mit den Zellkomponenten (Mitochondrien etc.) gefunden werden.

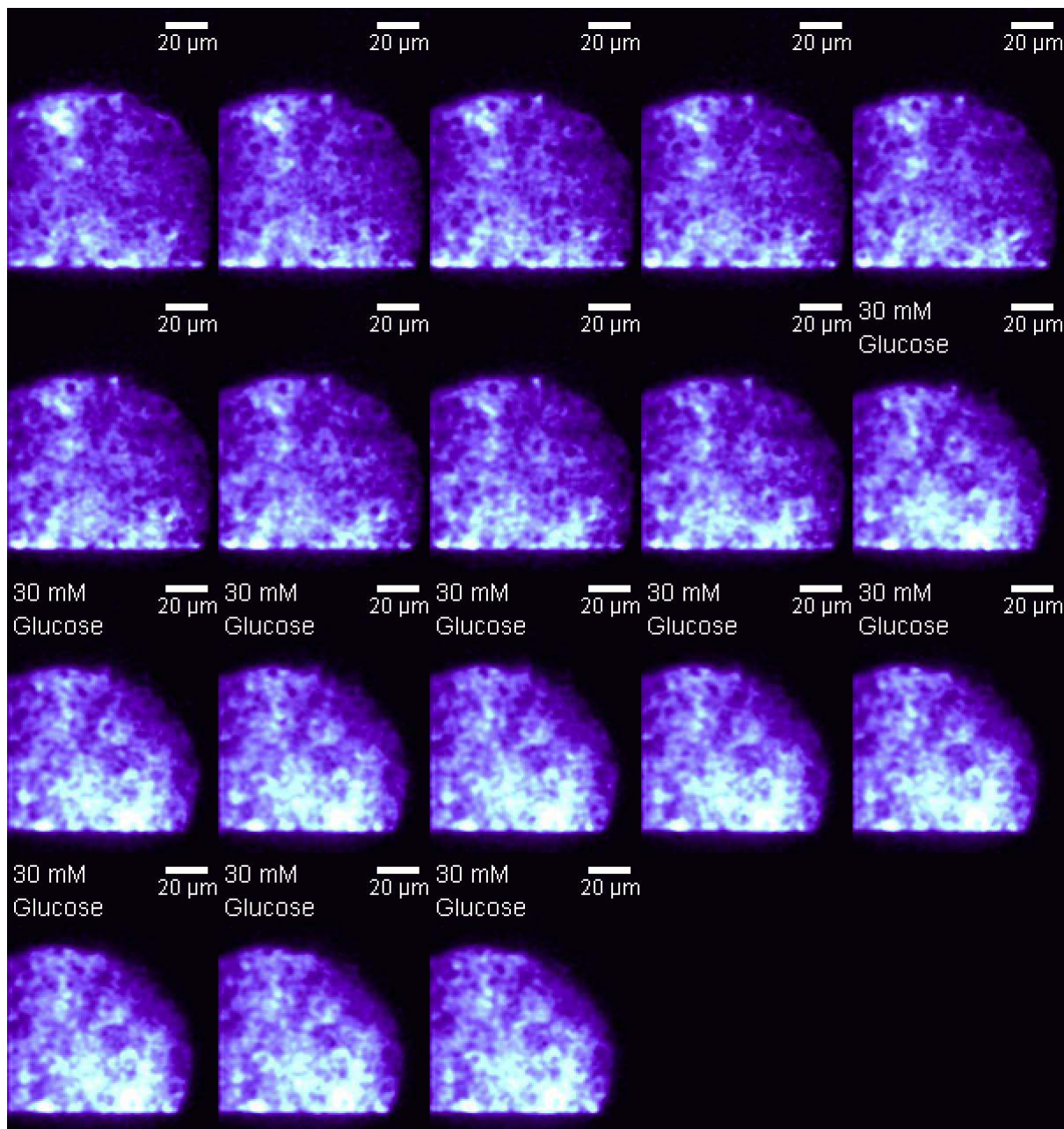


Abbildung 5-13 Falschfarben-Intensitätsbilder einer Pankreasinsel im Verlauf einer Stimulationsmessung, Zeitabstand ca. 2 min



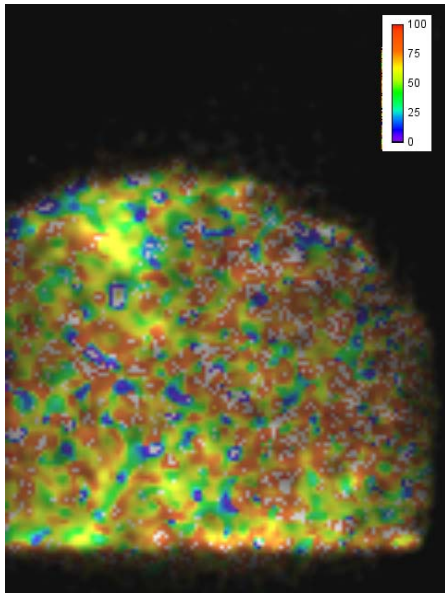


Abbildung 5-14 Verteilung des Anteils von gebundenem NAD(P)H bei einer Pankreasinsel in Prozent.

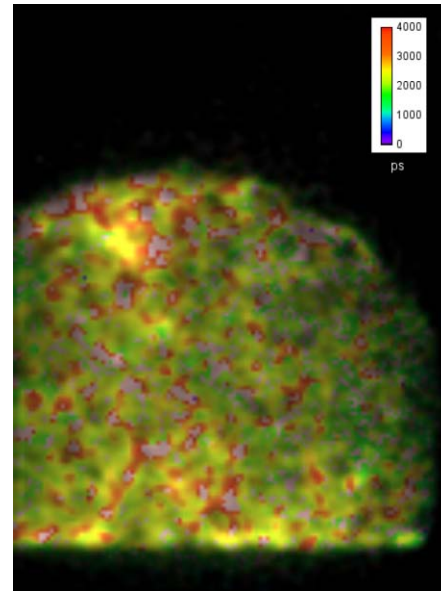


Abbildung 5-16 Verteilung der Lebensdauer des gebundenen NAD(P)H bei einer Pankreasinsel

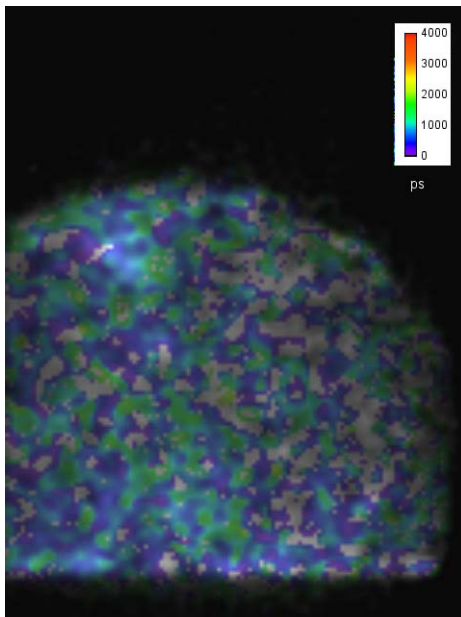


Abbildung 5-15 Verteilung der Lebensdauer des freien NAD(P)H bei einer Pankreasinsel

Die Auswertung der Stimulationsmessungen von mehreren Inseln, die in Abbildung 5-17 und Abbildung 5-18 dargestellt sind, bestätigt die Erkenntnisse, die aus den Daten der Messung an Einzelzellen gewonnen wurden. Auch beim Zellverbund kommt es mit Mittel bei Stimulus mit 30 mM Glucose zu einer Erhöhung der Intensität, die Verhältnisse von gebundenem zu freiem NAD(P)H ändern sich jedoch nicht wesentlich. Auch hier ist daher die Änderung der Intensität auf eine generelle Konzentrationserhöhung von NAD(P)H zurückzuführen.

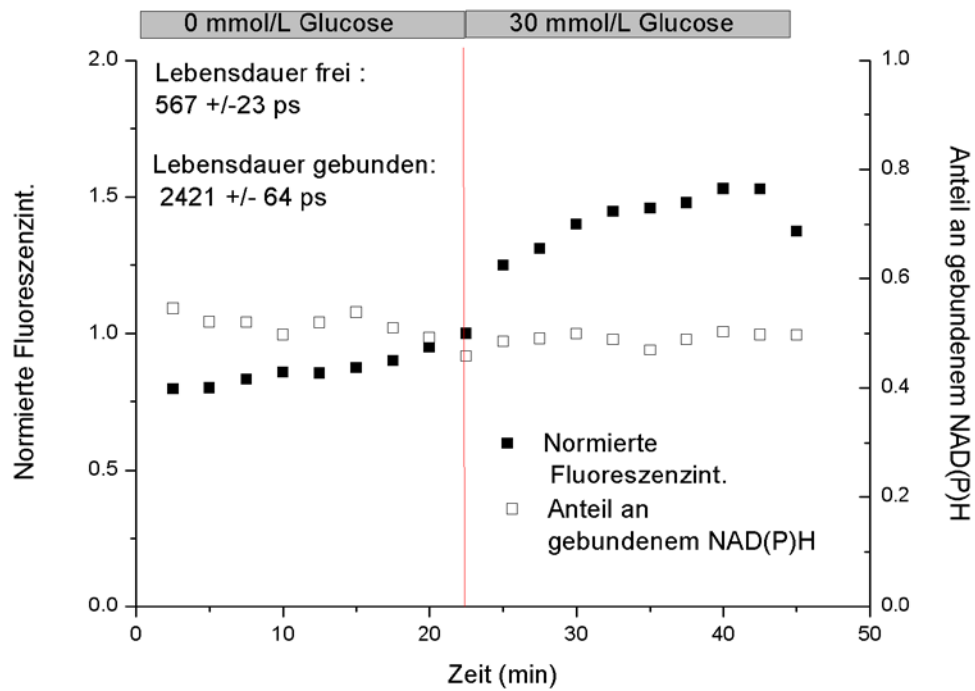


Abbildung 5-17 Vergleich zwischen relativer Änderung der Intensität/Verhältnis der Vorfaktoren bei einer Stimulationsmessung

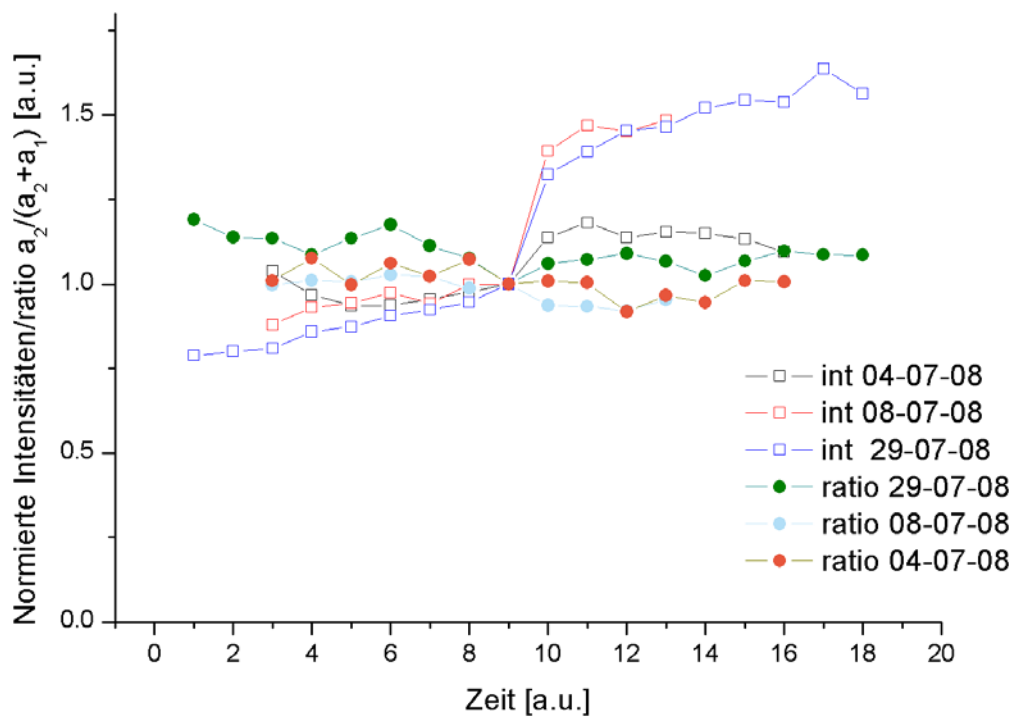


Abbildung 5-18 Vergleich zwischen relativer Änderung der Intensität/Verhältnis der Vorfaktoren (drei verschiedene Inseln), normiert auf den Zeitpunkt der Stimulation

### 5.1.2 Stimulierungen mit KIC

Wie oben beschrieben ändert sich die Autofluoreszenz bei Pankreaszellen nicht nur bei der Gabe von Glucose sondern auch bei anderen Kohlenhydraten. Daher wurde nicht nur eine Stimulierung mit Glucose, sondern auch mit KIC ( $\alpha$ -Ketoisocapronsäure) durchgeführt [119]. Sie wird auf einem anderen metabolischen Weg als Glucose verarbeitet, steigert aber ebenfalls die Insulinsekretion; auch unter Bedingungen, wenn Glucose dies nicht tut [120]. Die genaue Untersuchung der Wirkungsweise von KIC mit verschiedenen Methoden kann also einen Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der Insulin-Sekretion liefern.

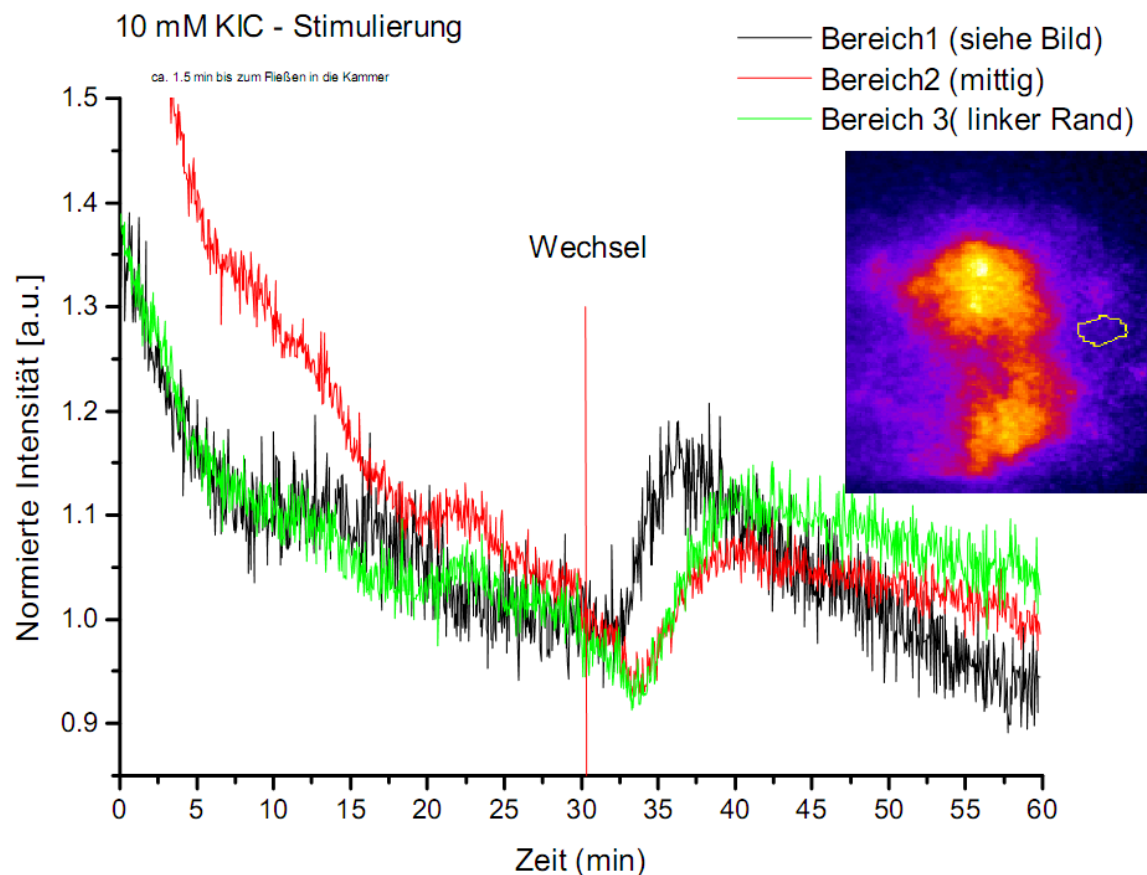


Abbildung 5-19 Stimulationskurve einer Insel mit 10 mM KIC, kleines Bild Falschfarbenintensitätsbild der Autofluoreszenz

Analog zur Stimulation mit 30 mM Glucose wurde auch bei KIC getestet, ob die Intensitätsstimulationskurven beim Zweiphotonenmikroskop einen ähnlichen Verlauf wie bei den Messungen aus Abbildung 5-2 haben. Dies konnte bestätigt werden, wie in Abbildung 5-19 dargestellt.

In Abbildung 5-20 sind die Ergebnisse einer Stimulierung mit KIC dargestellt. Hier wurden Intensitäts- und FLIM-Daten simultan aufgenommen. Der Verlauf der Intensitätskurve ist analog zu Abbildung 5-2, eine Änderung des Verhältnisses der Vorfaktoren beim Wechsel des



Mediums ist nicht festzustellen, dabei sind relativ große Schwankungen innerhalb der Perfusion mit einem Medium zu erkennen. Die Änderung der Autofluoreszenz resultiert also auch bei der Stimulierung mit KIC aus der im Mittel höheren Konzentration an NAD(P)H und nicht aus einer Verschiebung des Verhältnisses.

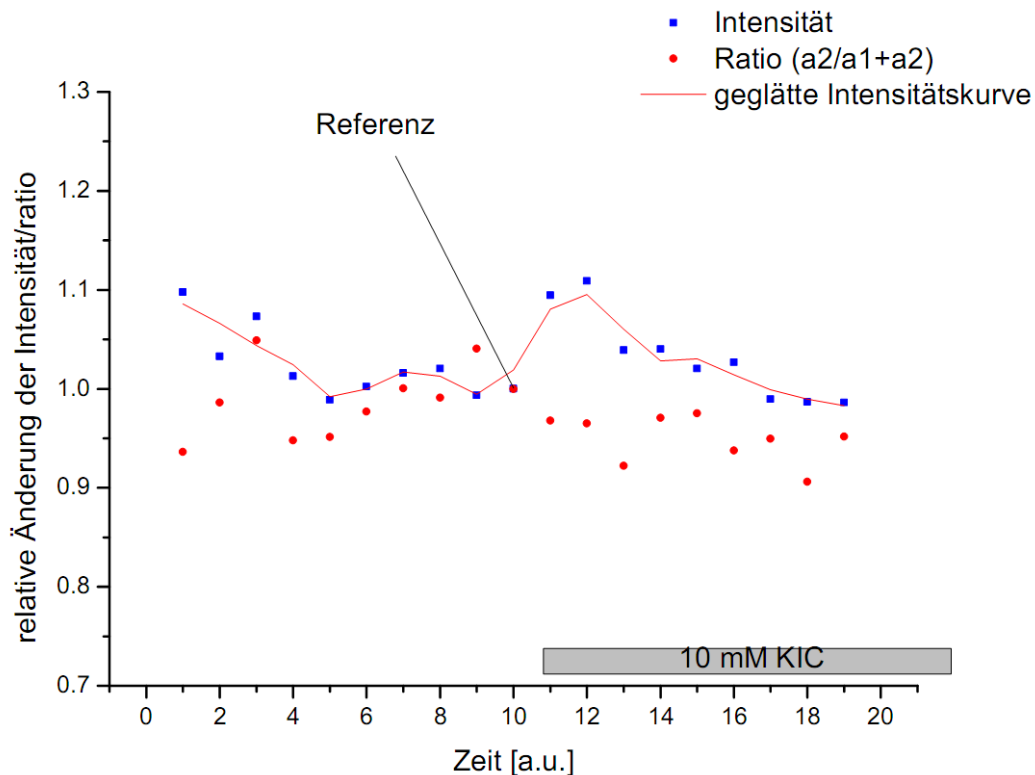


Abbildung 5-20 Verlauf einer Stimulierungsmessung einer Pankreasinsel, Vergleich der Änderung von Intensität und des Anteils an gebundenem NAD(P)H bezogen auf einen Referenzpunkt direkt vor der Stimulierung mit 10 mmol/L KIC

### Vergleich mit der Literatur

Aus den Stimulationen mit Glucose und KIC in Pankreaszellen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der Beitrag der Änderung der Quantenausbeute sehr klein und mit den eingesetzten Methoden nicht messbar ist. Die Schwankungen der Vorfaktoren innerhalb eines Mediums sind relativ groß. Bei vorsichtiger Interpretation lässt sich bei den Messungen in den Inseln ein leichter Trend zu kleinerem Anteil von  $a_2$  (weniger gebundenes NAD(P)H) beobachten, was für eine minimale Erhöhung der freien NAD(H)-Konzentration sprechen würde. Der Hauptteil des Anstiegs der Autofluoreszenz ist aber auf eine allgemeine Konzentrationserhöhung von NAD(P)H zurückzuführen. Dabei muss sowohl die Konzentration an freiem

als auch an gebundenem NAD(P)H steigen, da das Verhältnis nahezu gleich bleibt. Die Lebensdauern bewegen sich in einem Bereich, der mit Messungen an biologischen Proben in der Literatur übereinstimmt. Die freie Lebensdauer bewegt sich zwischen 350-600 ps und die gebundene Lebensdauer liegt bei ca. 2500 ps und ist breit verteilt. Die Vorfaktoren können je nach Zelltyp und Zellalter sehr unterschiedlich (s. z.B. [85,117,121]) sein, ein Anteil von ca. 50 % gebundenem NAD(P)H wie widerspricht daher nicht der Literatur.

In der Literatur wird eine Änderung der Lebensdauer oder des Verhältnisses von freiem zu gebundenem NAD(P)H hauptsächlich bei drastischen Eingriffen in den Stoffwechsel durch Sauerstoffmangel oder durch Blockierung der Atmungskette beobachtet [16,117,118]. Hier steigt der Anteil an freiem NADH an, da es nicht mehr in der Atmungskette oxidiert werden kann. Diese Änderungen wurden hauptsächlich mit hoch zeitaufgelösten TCSPC-Systemen bei auf Deckgläschen angewachsenen, unempfindlichen Einzelzellen gemessen. Die in dieser Arbeit vermessenen isolierten Inseln des Pankreas und die  $\beta$ -Zellen sind dagegen verhältnismäßig empfindliche biologische Systeme. In lebenden Zellverbänden/Organen wurden einige größere Änderungen in der Lebensdauer beim Vergleich zwischen normalen Hautzellen und Tumorzellen festgestellt [122]. Bei diesen Krebszellen war die mittlere Lebensdauer deutlich geringer als bei normalen Zellen, was auf metabolische Änderungen zurückgeführt wurde.

Eine ausführliche Studie der Fluoreszenzlebensdauern/Vorfaktoren von NAD(P)H in Leberzellen bei normalen physiologischen Bedingungen und bei Stimulation mit vielen Substanzen wurde von Wakita *et al.* [123] durchgeführt. Sie stellten weder Änderungen im Verhältnis der Vorfaktoren noch in den Lebensdauern fest und interpretierten eine Erhöhung der Autofluoreszenzintensität unter diesen verschiedenen Bedingungen als eine generelle Erhöhung der Menge an NAD(P)H.

Eine weitere NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauer-Studie wurde an Zellsuspensionen von Adipocyten durchgeführt [86]. Diesen Suspensionen wurde jeweils der Atmungskettenblocker Rotenon und 30 mmol/L Glucose zugeführt. Analog zu oben aufgeführten Studien wurden auch hier bei Rotenon eine deutliche Erhöhung der Intensität und eine Verringerung der mittleren Lebensdauer gemessen. Bei Glucose ergab sich ein ähnliches Bild, die Verringerung der Lebensdauer war aber deutlich kleiner. Auch hier wird der Intensitätsanstieg auf eine Erhöhung der NAD(H)-Konzentration zurückgeführt. Jedoch wurden bei den Messungen in Küvette, ohne räumliche Auflösung und mit Einphotonenanregung gearbeitet, während in dieser Arbeit die Zweiphotonen angeregte Fluoreszenz von Einzelzellen/Zellverbänden auch räumlich aufgelöst wurde.

Zusammengefasst ergibt ein Vergleich der gemessenen Daten mit den Literaturdaten folgendes Bild: Eine direkte 1:1 Übertragung der Ergebnisse der Studien ist aufgrund der vielen unterschiedlichen Zelltypen und Methoden zwar nicht möglich, aber allgemeiner Trend ist, dass eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität hauptsächlich einer Erhöhung der Gesamtmenge an NADP(H) zugeschrieben werden wird.

## 5.2 Calcium-Messungen

### 5.2.1 Fura-2

Zur Messung der Calciumkonzentration werden bei *in vitro* Messungen hauptsächlich nur indirekte Methoden eingesetzt werden. Dazu werden Fluoreszenzfarbstoffe wie Fura-2 benutzt [124]. Wie fast alle Calciumindikatoren basiert er auf zwei Gruppen, dem eigentlichen Calcium-Chelator-Molekül BAPTA (bis(o-amino-phenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) [125] und einem für die Fluoreszenz verantwortlichen Teil, in diesem Falle ein Benzofuran, an welches ein Oxazolin gebunden wurde (s. Abbildung 5-21, grün). Er ist seit Mitte der achtziger Jahre der am meisten benutzte Calciumindikator und wird auch am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig für die qualitative Messung von Calciumkonzentration eingesetzt. Die etablierte Methode zur Bestimmung der Calciumkonzentration mit Fura-2 ist die sogenannte Ratiomethode, bei der die Konzentration anhand der Intensität der Fluoreszenz bei zwei verschiedenen Wellenlängen und dem Vergleich mit der Fluoreszenz von Kalibrierungslösungen (bekannte Calciumkonzentrationen) bestimmt wird [19].

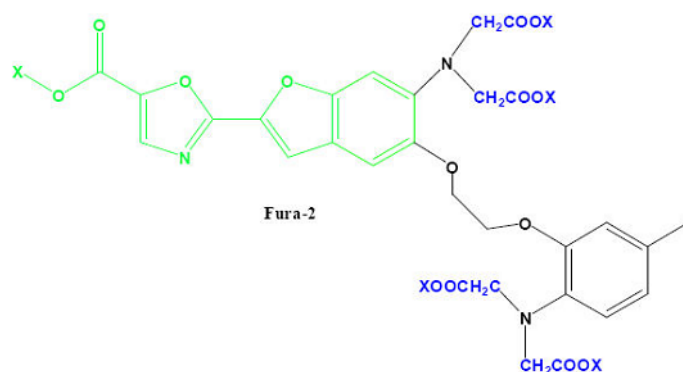


Abbildung 5-21 Molekülstruktur von Fura-2, grün Fluorophor Teil, blau chelatisierende Gruppen

Fura-2 reagiert auf Änderungen der Calciumkonzentration sehr empfindlich; bei Bindung eines Calciumions ändert sich sowohl das Absorptionsspektrum (s. Abbildung 5-22) als auch die Lebensdauer [27]. Dies ist auf die Bildung eines Chelatkomplexes zurückzuführen, bei dem ein Calciumion das Zentralatom ist. Dieser Komplex liegt im Gleichgewicht mit der freien Form des Indikators vor. Die Affinität eines Calciumindikators zu Calcium wird über eine Dissoziationskonstante  $K_d$  beschrieben. Deren Größe gibt den empfindlichen Messbereich der Indikatoren vor. Da FLIM-Messungen im Gegensatz zu Intensitätsmessungen sowohl unabhängig von der lokalen Fluorophor-Konzentration als auch von der Anregungsintensität sind, wurde daher als Alternativmethode der Einsatz von FLIM bei der Bestimmung von Calciumkonzentrationen in isolierten Pankreasinseln und MIN6-Zellen untersucht.

Die Änderung der Lebensdauer von Fura-2 wurde zunächst in Lösung mit verschiedenen, exakt definierten Calciumkonzentration gemessen, um eine Kalibrierung am Messsystem durchzuführen. In Abbildung 5-24 ist das Ergebnis einer solchen Kalibrierungsmessung zu sehen. Die ungebundene Form von Fura-2 hat eine Lebensdauer von ca. 1000 ps und die Calcium gebundene Form eine Lebensdauer ca. 1450 ps. Ab einer bestimmten Calciumkonzentration liegt nur noch die gebundene Form vor, alle Lebensdauern, die zwischen diesen beiden Extremwerten liegen, spiegeln den Anteil von gebundenem (Chelatkomplexe) und freiem Farbstoffs wider. Bei den Messungen wurde mit Calciumkonzentrationen gearbeitet, die im physiologischen Bereich von Zellen liegen (0 – 39  $\mu\text{mol/L}$ ). Ein sigmoidaler Fit ergibt eine scheinbare Dissoziationskonstante  $K_d$  von 0.745  $\mu\text{mol/L}$ . Die aus Intensitätswerten ermittelte Konstante liegt bei 0.135  $\mu\text{mol/L}$  [126]. Der empfindliche Messbereich ( $0.1 K_d$  bis  $10 K_d$ ) für Fura-2 ist daher bei Lebensdauermessungen zu höhere Calciumkonzentrationen verschoben. Diese Verschiebung ist durch die Auswertetechnik (lineare Regression) begründet: Ein biexponentieller Fit (nicht gezeigt) gibt die Verhältnisse von ungebundener zu gebundener Form besser wieder, eignet sich jedoch für schnelle Calciumkonzentrations-Messungen aufgrund seiner Langsamkeit nur bedingt. Die Änderung der Dissoziationskonstante schränkt jedoch die generelle Anwendbarkeit von Fura-2 für Messungen an Zellen jedoch nicht ein.

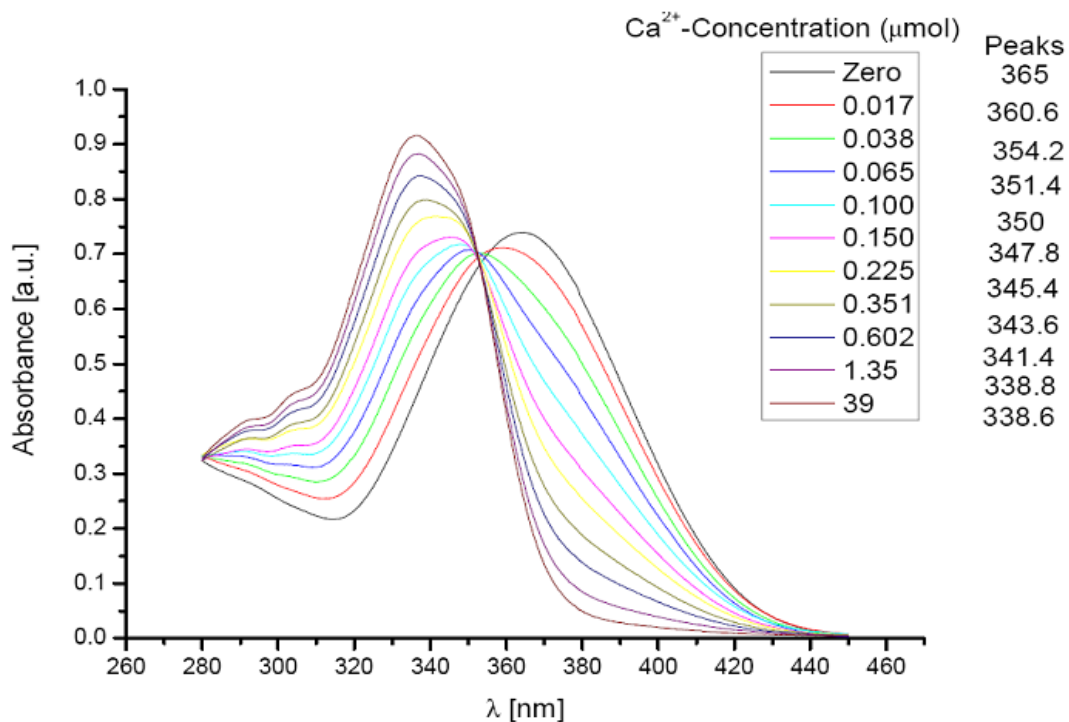


Abbildung 5-22 Absorptionsspektren Fura-2 bei verschiedenen Calciumkonzentrationen [127].

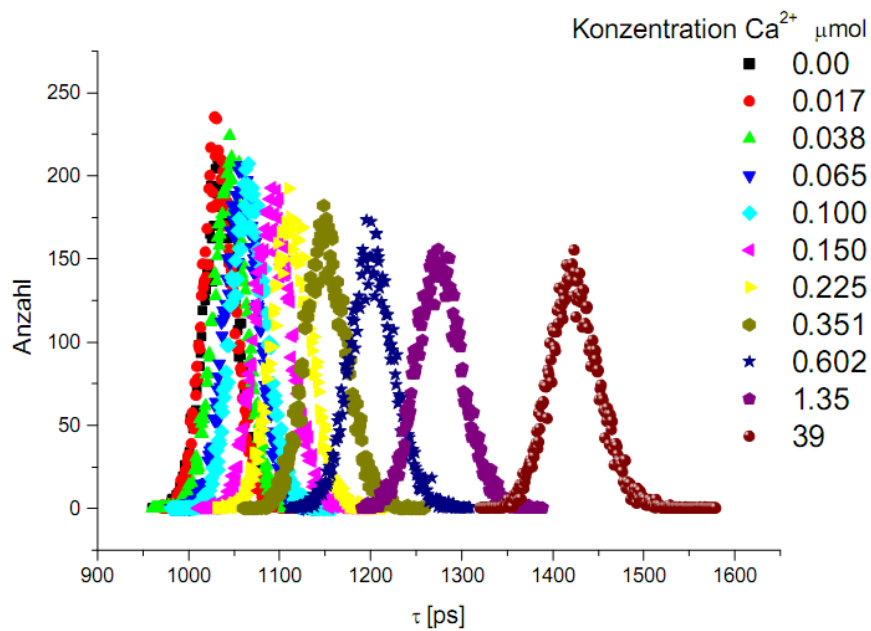


Abbildung 5-23 Lebensdauer-Verteilungen von Fura-2 bei verschiedenen Calciumkonzentrationen [127]

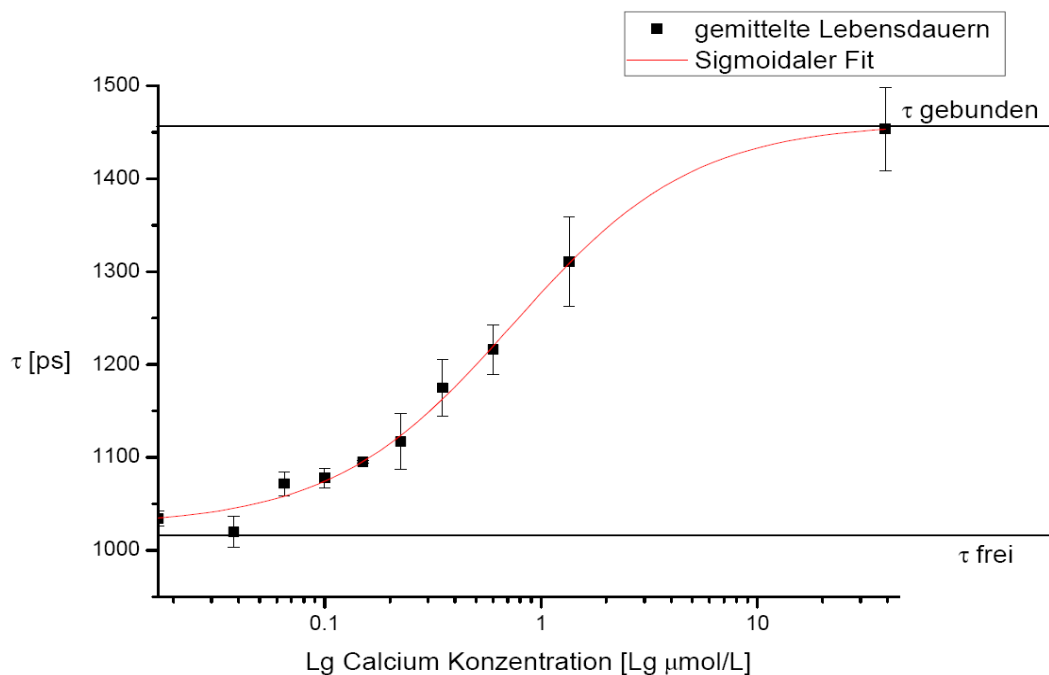


Abbildung 5-24 Auftragung der Lebensdauer gegen die Calciumkonzentration (logarithmische Auftragung) [127]

Nach den Kalibrierungsmessungen wurden verschiedene Methoden getestet, um die MIN6-Zellen gut mit dem Calciumindikator anzufärben. Der Calciumindikator kann in seiner ionischen Form (hydrophil) durch die Zellmembran (hydrophob) dringen, zur Anfärben wird daher die Esterform (hydrophil) des Indikators verwendet. Diese wird nach Aufnahme von zellulären Esterasen gespalten, in der Zelle liegt dann die normale ionische Form vor, die Calcium binden kann [128].

Anschließend wurden FLIM-Messungen an diesen Zellen durchgeführt. In Abbildung 5-25 sind vier verschiedene Histogramme über Lebensdauerbilder von MIN6-Zellen abgebildet. Es zeigt sich, dass die Verteilung der Lebensdauer relativ homogen innerhalb einer Zelle ist. Jedoch ist die Lebensdauer in den Zellen viel höher als erwartet, wenn man sie mit den Kalibrierungsmessungen vergleicht. Die Ruhe-Calciumkonzentration in Zellen liegt bei ca. 150 nmol/L, d.h. *in vivo* und Kalibrierungsmessungen sind nicht unmittelbar miteinander vergleichbar. Die Lebensdauer von Fura-2 liegt in den Zellen vermutlich höher, weil eine Bindung an Proteine stattfindet [27]. Ähnliche Probleme der Vergleichbarkeit von *in vitro* und *in vivo*-Messungen treten auch bei Intensitätsmessungen auf. Mit so genannten Ionophoren [19,126] kann eine intrazelluläre Calciumkalibrierung gelingen. Die Zellmembran wird dabei durchlässig für Calciumionen und durch Vorgabe einer definierten extrazellulären Calciumkonzentration kann man eine definierte intrazelluläre Calciumkonzentration einzustellen. Diese Prozedur ist relativ aufwendig und kann nicht von Zelllinie zu Zelllinie übertragen werden. Deshalb wird vielfach bei Messungen bei denen es eher auf qualitative Aussagen ankommt, wie z.B. Stimulierungsmessungen bei Langerhansschen Inseln, darauf verzichtet [89,120]. Dort richtet sich das Interesse vielmehr auf die Größe und den Zeitpunkt einer Änderung als auf die absolute Bestimmung der Konzentration. Im weiteren Verlauf wurde daher auch bei FLIM-Messungen auf intrazellulären Kalibrierungsmessungen verzichtet.

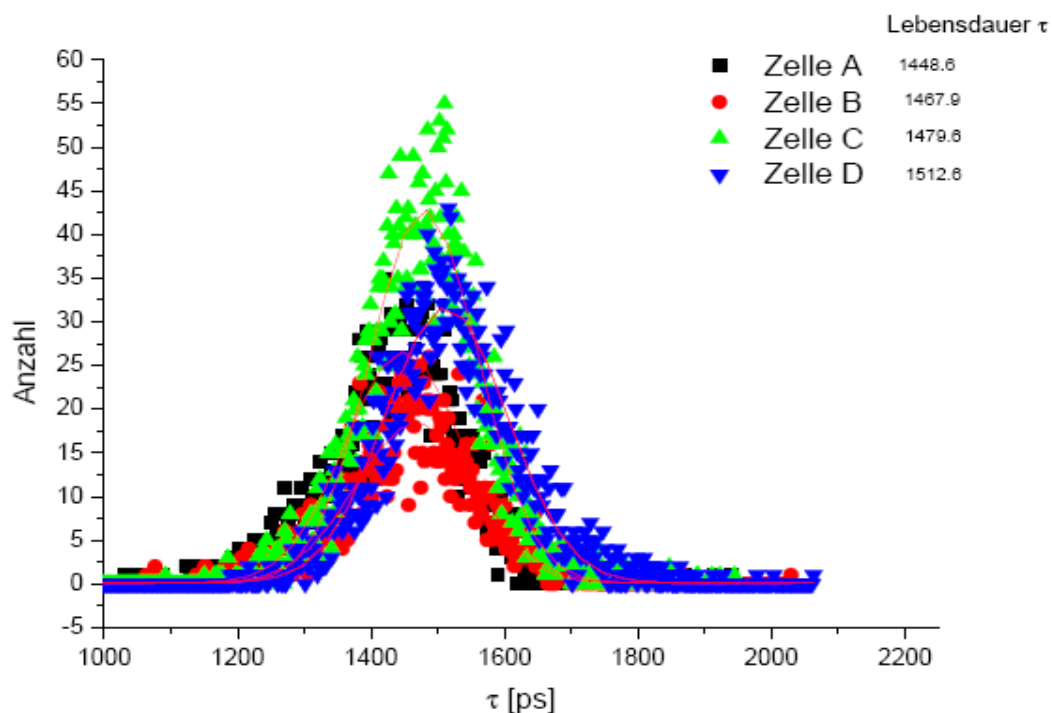


Abbildung 5-25 Histogramme über die Lebensdauerbilder von Fura-2 angefärbten MIN6-Zellen [127]

Nach Durchführung der FLIM-Messungen an MIN6-Zellen wurde die Stimulation von Inseln untersucht. Die Intaktheit der Inselzellen und allgemeine Stimulationsfähigkeit lässt sich mit einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration ( $> 40$  mM) im Nährmedium untersuchen. Die Inseln befinden sich während einer solchen Messung in einer Umströmungskammer und werden mit Nährmedium versorgt. Zur Stimulation wird das Medium gewechselt (erhöhte Kaliumkonzentration), dabei kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembranen und Calciumionen strömen von außen ins Zytosol, dort steigt infolgedessen die Calciumkonzentration stark an und erreicht nach einiger Zeit einen konstanten Level. Dieser Prozess ist reversibel und vollzieht sich innerhalb einer Minute. Diese Erhöhung der Calciumkonzentration sollte bei intakter Zelle anhand von Lebensdauer- bzw. Intensitätsmessungen feststellbar sein.

Um die Reaktion der Inseln auf erhöhte Kaliumkonzentration bei unserem Messsystem zu testen, wurde zunächst reine Intensitätsmessungen bei konstanter Leistung und Wellenlänge durchgeführt. Abbildung 5-26 zeigt den Verlauf einer Messreihe, mit wechselnden Stimulations-(Kaliumkonz. 40 mmol/L)- und Ruhephasen (KR= normale Kaliumkonz. 5 mmol/L). Dieser Verlauf entspricht den Erwartungen: Eine Erniedrigung der Fluoreszenzintensität bei erhöhter Kaliumkonzentration ist auf die spektrale Verschiebung des Absorptionsspektrums von Fura-2 zurückzuführen. Bei der für Fura-2 verwendeten Anregungswellenlänge (740 nm), ist der Absorptionsquerschnitt der gebundenen Form geringer als der der freien Form. Es kann daher auf eine erhöhte Calciumkonzentration geschlossen werden, bzw. eine Intaktheit der Insel angenommen werden.



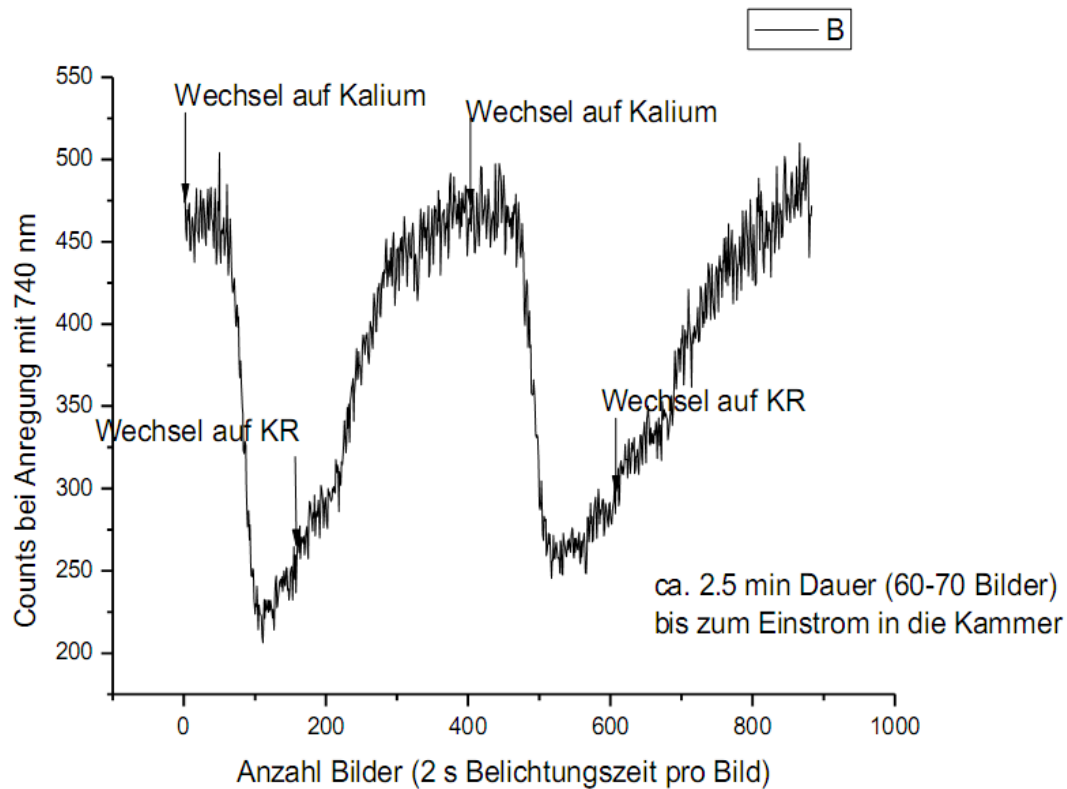


Abbildung 5-26 Intensitätsverlauf einer Stimulationsmessung an einer Insel (Färbung mit Fura-2).

Parallel dazu wurden auch Lebensdauerdaten gemessen. Die Zellen der Inseln sind auch deutlich kleiner als MIN6-Zellen, daher ist es schwer Aussagen über subzelluläre Calciumkonzentrationen zu treffen. Verlässliche Aussagen über das Niveau der Calciumkonzentration können also nur auf mehrere Zellen bezogen gemacht werden.

In Abbildung 5-27 ist ein Vergleich von Intensitätsdaten und FLIM-Daten, die aus dem gleichen Datensatz (Inselmessungen) erzeugt wurden, zu sehen. Es wurde zu zwei Zeitpunkten mit Kalium stimuliert. Die Intensitätskurve hat erwartungsgemäß einen ähnlichen Verlauf wie in Abbildung 5-26, die Lebensdauerkurve zeigt anfangs den erwarteten Verlauf, das heißt bei Kaliumstimulation erhöht sich die Lebensdauer. Im weiteren Verlauf jedoch ändert sich die Lebensdauer nur noch irregulär und nicht mehr in direkter Korrelation mit der Intensität.

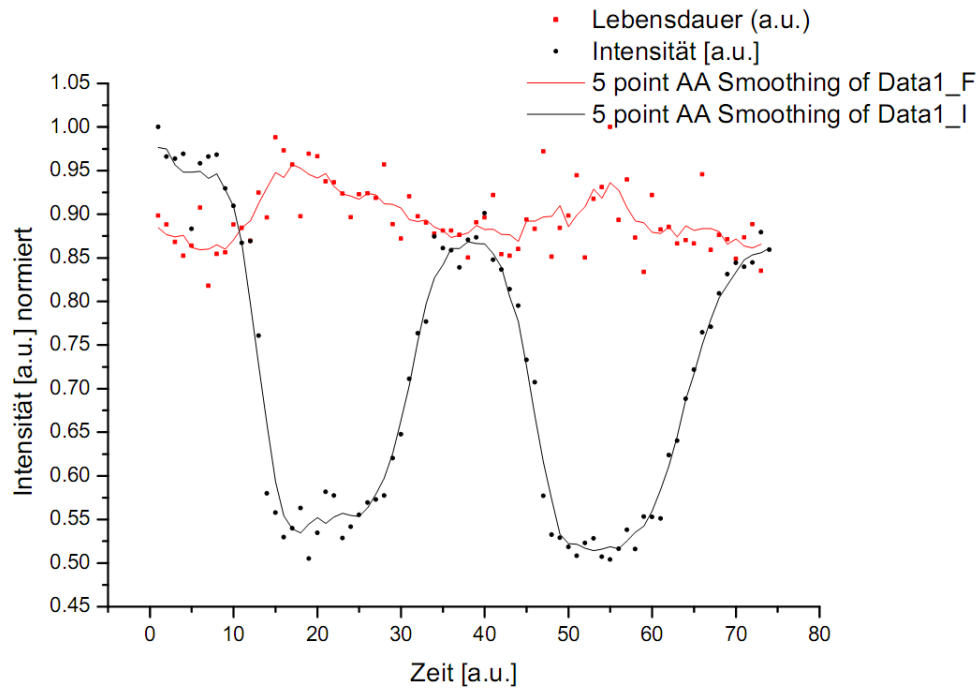


Abbildung 5-27 Stimulationsmessungen: Vergleich Lebensdauer und Intensität.

In Abbildung 5-28 sind Lebensdauerbilder von einem Teilbereich einer Insel zu sehen, die zu beliebig ausgewählten Zeitpunkten innerhalb der Umströmung mit den jeweiligen Medien erstellt wurden. Auch hier ist der Effekt der Kaliumstimulation als Erhöhung der Lebensdauer zu sehen.

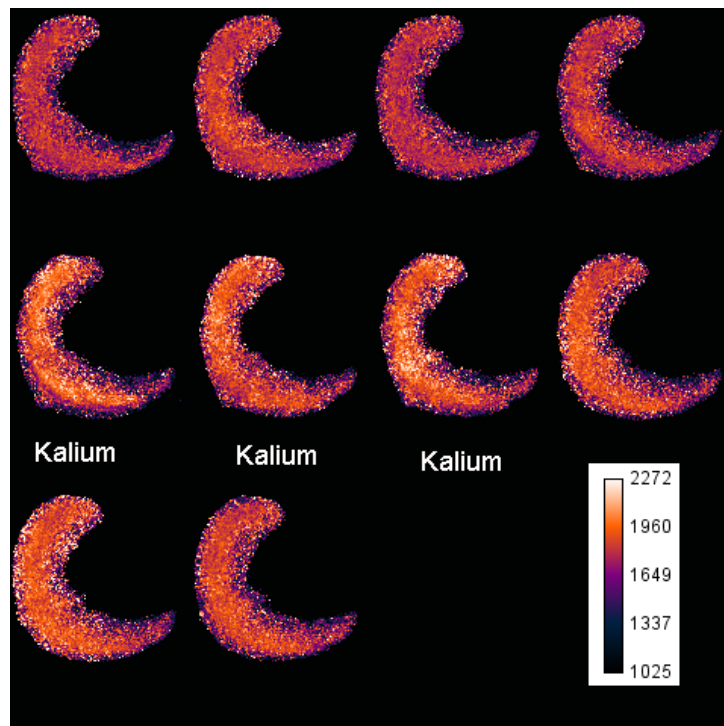
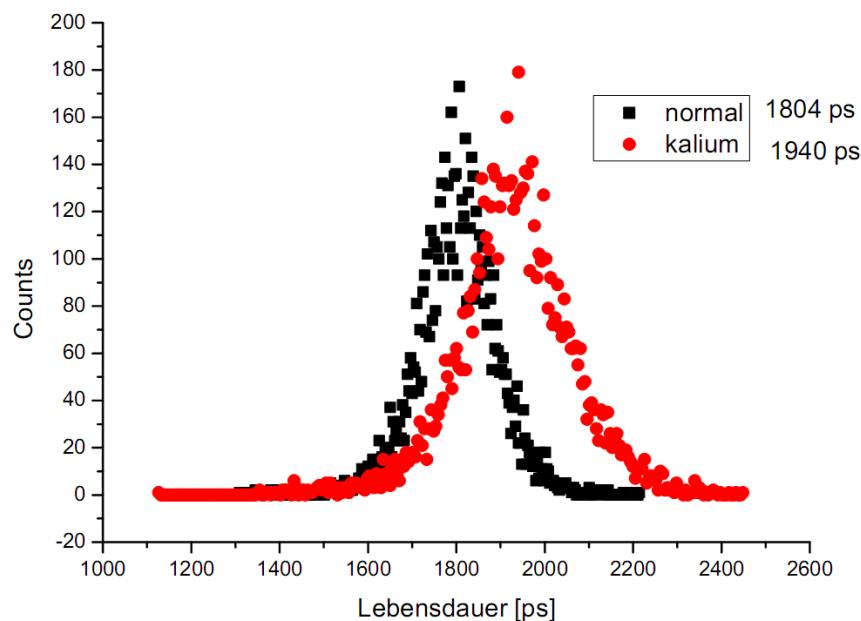


Abbildung 5-28 Zeitlich direkt aufeinander folgende Lebensdauerbilder [ps] aus den Randbereichen einer Pankreasinsel, Bilder ohne Benennung: Umströmung mit normalen Medium.

In Abbildung 5-29 sind zwei Histogramme über die Lebensdauerbilder von Abbildung 5-28 zu sehen, bei normaler Kaliumkonzentration und bei erhöhter Kaliumkonzentration. Es kommt zu einer mittleren Erhöhung der Lebensdauer um ca. 140 ps, lokal bis 200 ps.

Aus den MIN6- und den Inselmessungen lässt sich folgern, dass sich über Lebensdauermessungen mit dem Indikator Fura-2 Änderungen der Calciumkonzentrationen auch in Zellen nachweisen lassen. Die Messungen von Wilms et al. [129] konnten in dieser Hinsicht sowohl durch die Lösungsmessungen und die Zellenmessungen widerlegt werden: Eine Änderung in den Lebensdauern durch Calcium ist auch durch Zweiphotonenspektroskopie messbar. Hinsichtlich der Geschwindigkeit der Aufnahme von Daten und der Genauigkeit bei Stimulationsmessungen gibt es Verbesserungsmöglichkeiten. Jedoch macht die geringe Lebensdauerdifferenz zwischen der freien und gebundenen Form von Fura-2 die Daten schwer interpretierbar; das Rauschen oder andere Schwankungen bei den Messungen wirken sich stark aus. Eine größere Lebensdauerdifferenz würde die Messungen also genauer machen.



**Abbildung 5-29** Histogramme über zwei Lebensdauerbilder von Abbildung 5-28: (normales Medium) und Stimulation mit Kalium.

Neuere Forschungsergebnisse zu Calciumfarbstoffen berichten, dass Fura-2 für Multiphotonenmessungen/Lebensdauermessungen nicht der ideale Calciumindikator ist. Dies konnte durch unsere Messergebnisse bestätigt werden. Der Lebensdauerunterschied zwischen der freien und Calcium-gebundenen Form ist zu gering für verlässliche Messungen. Als mögliche Alternative wurden bei Wilms *et al.* z.B. Calcium Orange oder Oregon-Green BAPTA 488-1® genannt [130].

Diese Indikatoren sind keine ratiometrischen Indikatoren wie Fura-2; bei Bindung an Calcium steigt nur die Emissionsintensität bzw. Quantenausbeute. Beide Indikatoren sind aber gerade deshalb besonders für Lebensdauermessungen geeignet. *In vitro*-Messungen zeigen, dass bei diesen Indikatoren eine deutlich größere Differenz zwischen den Lebensdauern der freien und der gebundenen Form besteht, als es bei Fura-2 der Fall ist. Sie sind daher potenziell auch für Zellenmessungen sensitiver und genauer für Konzentrationsänderungen.

Erste Messungen mit den Indikatoren zeigten, dass es auch bei diesen Indikatoren zu einer Beeinflussung der Lebensdauern der freien und gebundenen Form in der Zelle kommt, somit ist analog zu Fura-2 auch hier keine direkte Übertragung der *in vitro* Messungen auf Zellmessungen gegeben [130].

### 5.2.2 Andere Calciumindikatoren

Neben Fura-2 als ratiometrischen Calciumindikator gibt es eine Reihe von anderen, nicht ratiometrischen Indikatoren, die speziell für verschiedene biologische Einsatzzwecke/Geräte synthetisiert wurden. Sie unterscheiden sich zum einen in ihrer Affinität zu Calcium, in ihrer Absorptionswellenlänge (Absorptionsmaximum im sichtbaren Bereich) und dem Ausmaß der Intensitätsänderung des Emissionsspektrums [19].

Zusätzlich zu Fura-2 wurden aus den oben beschriebenen Gründen zwei weitere Calciumindikatoren getestet. Calcium Orange ® (CO) und Oregon-Green BAPTA-1 ® (OGB-1) besitzen eine ähnliche Grundstruktur wie Fura-2, jedoch mit anderen chromophoren Gruppen (Rhodamin- und Fluoresceinderivate) (s. Abbildung 5-30). Bei Erhöhung der Calciumkonzentration steigt die Fluoreszenzintensität um ein vielfaches (CO: max. 3x, OGB-1: max. 14x). Die Dissoziationskonstanten liegen in einem ähnlichen Bereich wie Fura-2, der Empfindlichkeitsbereich für Calcium ist daher vergleichbar.

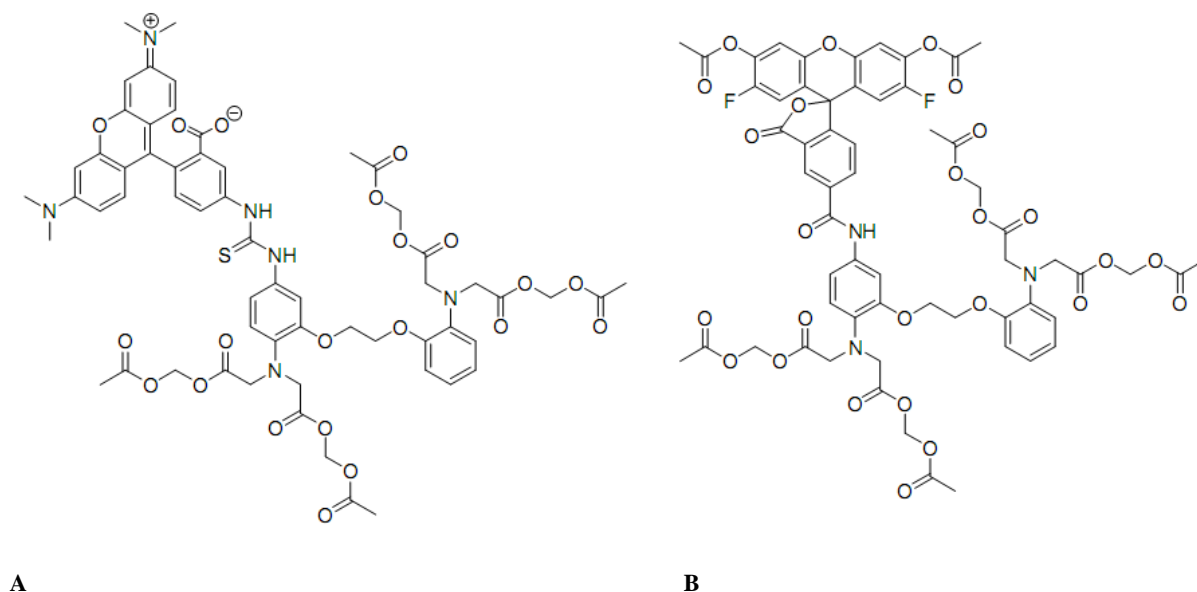


Abbildung 5-30 A Calcium-Orange –AM, B Oregon-Green-BAPTA-1 AM.

### *Calcium Orange*

Calcium Orange besitzt ein Emissionsmaximum bei 580 nm, die Fluoreszenz lässt sich daher gut von potenziell störender Autofluoreszenz abtrennen. Der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt ist bei der in den Experimenten verwendeten Wellenlänge (780 nm) etwas größer als von freiem Fura-2 [31]. Zunächst wurden für CO Kalibrierungsmessungen durchgeführt. In Abbildung 5-31 sind die Fluoreszenzabklingkurven bei verschiedenen Calciumkonzentrationen zu sehen. Wie erwartet ist bei niedriger Calciumkonzentration die Lebensdauer geringer als bei hoher. An diese Daten wurde eine biexponentielle Funktion gefittet, wobei angenommen wurde, dass die Lebensdauern konstant sind und nur die Vorfaktoren variieren (global fitting). Dieses Modell bildet das reale Verhältnis zwischen freiem Indikator (kurze Lebensdauer) und Calciumindikatorekomplex (lange Lebensdauer) gut ab. Bei Erhöhung der Calciumkonzentration ändert sich dieses Verhältnis und die Vorfaktoren geben direkt die Konzentration des jeweiligen Komplexes an. Die ermittelten Lebensdauern (ca. 580 ps und 1880 ps) liegen im Bereich der Literaturwerte [20].

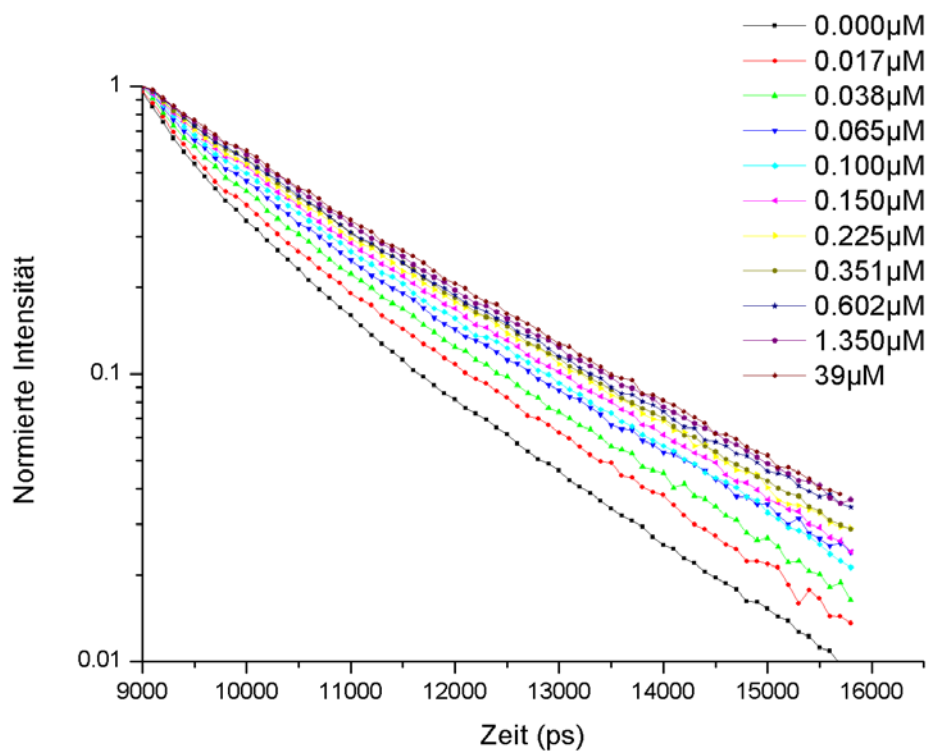


Abbildung 5-31 Fluoreszenzabklingkurven Calcium Orange bei verschiedenen Calciumkonzentrationen.

In Abbildung 5-32 sind die Vorfaktoren ( $a_f$  frei,  $a_g$  gebunden) gegen die Calciumkonzentration (logarithmisch) aufgetragen. Die Vorfaktoren ändern sich nicht so, wie man aus dem Modell erwarten würde (gegenläufiger sigmoider Verlauf,  $a_f$  von 1-0,  $a_g$  von 0-1). Zusätzlich wurde daher ein triexponentieller Fit an die Messdaten (nicht gezeigt) durchgeführt, der ergab, dass noch eine dritte Calcium unempfindliche Komponente existiert (siehe auch Wilms [129]). Der dynamische Bereich dieses Farbstoffs ist daher stark eingeschränkt.

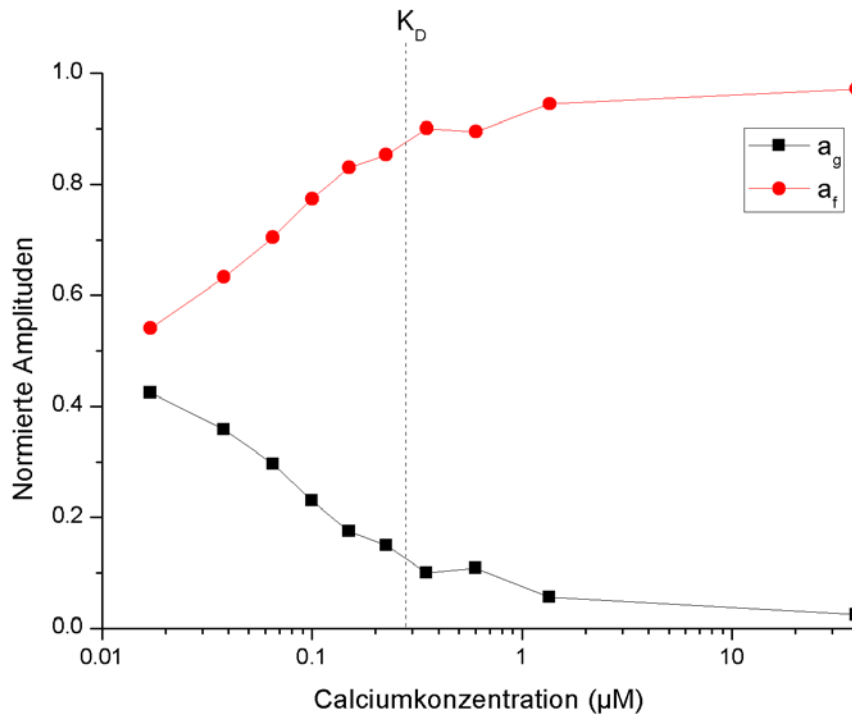


Abbildung 5-32 Auftragung der Amplituden  $a_f$  (freie Form) und  $a_g$  (gebundene Form) gegen logarithmische Calciumkonzentration, das  $K_D$  zeigt den Wert der Dissoziationskonstante aus der Literatur an.

Eine tri/biexponentielle Auswertung von FLIM-Daten ist relativ langsam im Vergleich zur monoexponentiellen. Eine monoexponentielle Auswertung der CO-Daten in Zellmessungen zeigte, dass die Änderung der Lebensdauer mit Erhöhung der Calciumkonzentration zu gering ist, als dass sie für verlässliche FLIM-Messungen in Zellen verwertbar wäre. Bei diesem Farbstoff ist man also zur biexponentiellen Auswertung gezwungen. Zusätzlich wurde bei Anwendung des Farbstoffes in MIN6-Zellen klar, dass CO sehr empfindlich für Photobleichung ist. In Abbildung 5-33 ist dies anhand eines in Zelle gebrannten Rasterfeldes zu erkennen

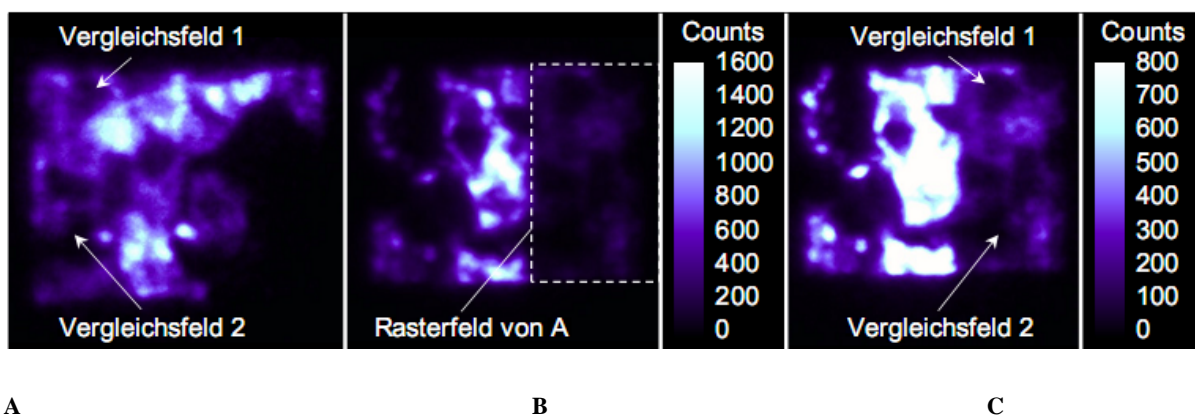


Abbildung 5-33 Photobleichung von Calcium Orange in MIN6-Zellen: A Intensitätsbild eines Rasters, B Intensitätsbild des Rasters an einer anderen Stelle C gleiches Bild wie in B, zur Verdeutlichung des Unterschiedes anderer Farbskalierung.

Ein weiteres Problem bei CO ist die so genannte „Compartmentalization“ [131], dabei kommt es zu lokalen Ansammlungen des Farbstoffs in Zellkompartimenten; das heißt, dass keine homogenes Anfärben der Zelle möglich ist, wie in Abbildung 5-34 gut zu sehen ist.

Aufgrund der beschriebenen Probleme wurden CO-Messungen trotz prinzipieller Eignung für FLIM-Messungen (siehe Abklingkurven) nicht weiterverfolgt.

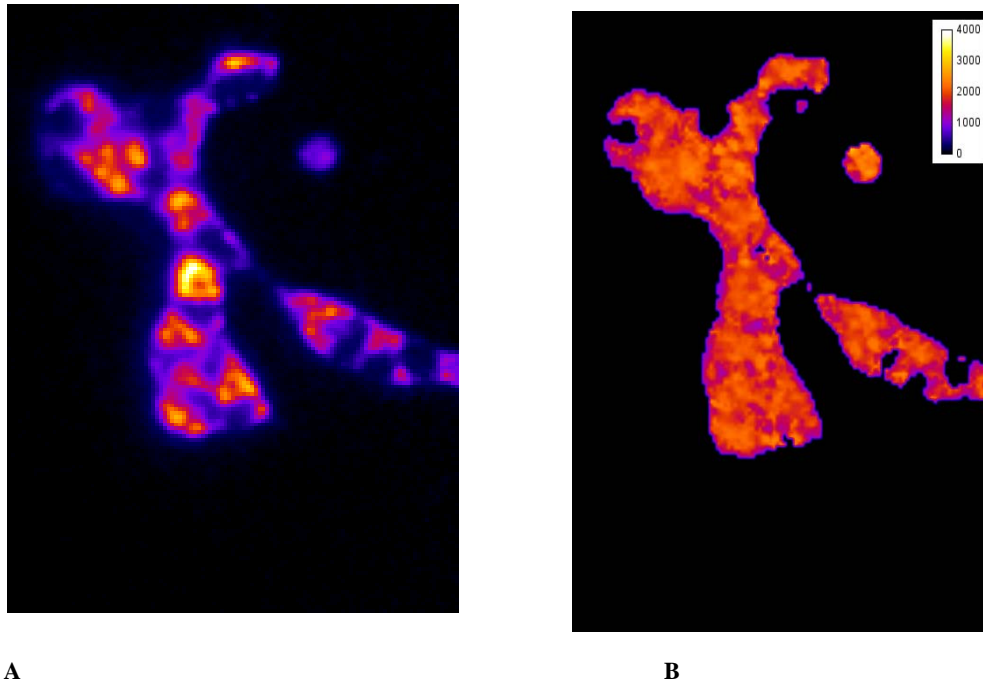


Abbildung 5-34 A Intensitätsbild einer mit CO angefärbten MIN6-Zelle (Falschfarbendarstellung), B Falschfarben-FLIM-Bild, Lebensdauerskala in ps.

### *Oregon-Green BAPTA-1 (OGB-1)*

Oregon Green hat ein Fluoreszenzmaximum bei 530 nm. Die Lebensdauerunterschiede zwischen der freien und der Calcium gebundenen Form sind sehr viel größer als bei CO und Fura-2 (ca. 400 ps frei, 3600 ps gebunden). Laut Literatur [130] sind keine Unreinheiten des Farbstoffs zu erwarten. Daher wurden keine Kalibrierungsmessungen vorgenommen, sondern direkt zu Kaliumstimulationsmessungen an MIN-6 Zellen übergegangen.

Die Stimulationsexperimente bei Anfärben mit OGB-1 hatten den gleichen Ablauf wie bei Fura-2. In Abbildung 5-35 ist ein solches Stimulierungsexperiment mit Kalium zu sehen. Im Gegensatz zu Fura-2 steigt bei OGB-1 wie erwartet die Fluoreszenzintensität an, wenn Calcium an den Indikator bindet.



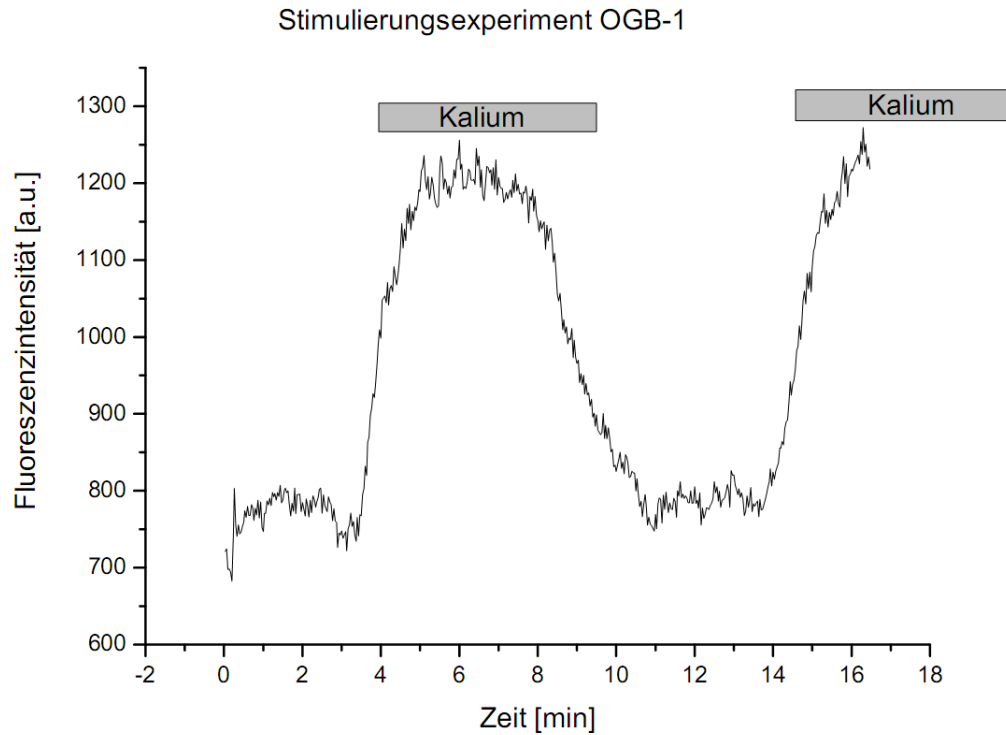


Abbildung 5-35 Intensitätsverlauf eines Stimulierungsexperiment mit Kalium an einer mit OGB-1 angefärbten MIN6-Zelle.

Es zeigte sich bei weiteren Experimenten, dass auch bei OGB-1 Photobleichung auftritt, diese jedoch bei entsprechender Reduzierung der Anregungsleistung vermieden werden kann.

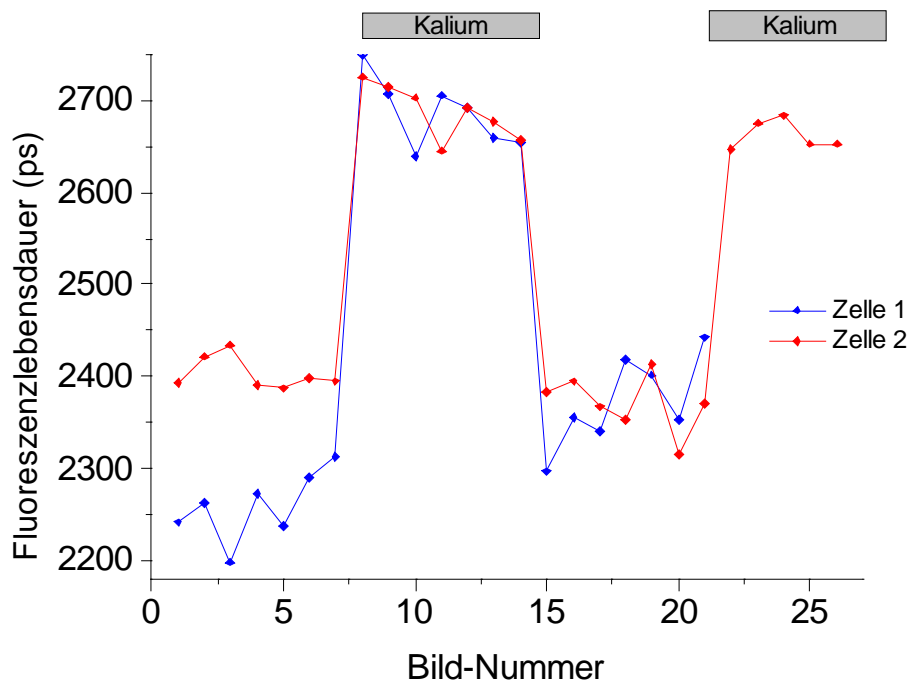


Abbildung 5-36 Stimulationskurve: Lebensdauerwerte ohne und mit Kaliumstimulation in zwei Zellen (insgesamte Dauer der Verlaufskurve ca. 40 min).

In Abbildung 5-36 ist der Verlauf einer Stimulationsmessung bei zwei verschiedenen MIN6-Zellen zu sehen. Bei Kaliumstimulation erhöht sich die mittlere Lebensdauer deutlich (monoexponentielle Auswertung). Die verschiedenen Lebensdauern der Zellen am Anfang der Stimulationskurven sind möglicherweise auf unterschiedlichem Ruhelevel der Calciumkonzentration zurückzuführen. Die Abklingkurven haben im Vergleich zu den Kalibrierungsmessungen aus der Literatur einen deutlich anderen Verlauf, d.h. die Fluoreszenzlebensdauer von OGB-1 ändert sich stark in intrazellulärer Umgebung, ähnlich wie es bei Fura-2 beobachtet wird. Eine biexponentielle globale Auswertung der Daten (siehe Abbildung 5-37 und Abbildung 5-38) ergab eine deutlich veränderte Lebensdauer der freien Form (von 400 ps auf ca. 1500 ps). Die Veränderung der Vorfaktoren  $a_1$  und  $a_2$  zeigt noch einmal deutlich, dass es bei Kaliumstimulation zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration kommt, der Anteil der an Calcium gebundenen Indikator-Form ( $a_2$ ) ist dann erhöht. Ein Vergleich zwischen monoexponentiellen und biexponentiellen Fit zeigte auch eine hinreichend gute Übereinstimmung des ersteren mit den Messdaten. Aufgrund der drastischen reduzierten Auswertungszeit bei einem monoexponentiellen Fit wurde dieser vorrangig zur Berechnung der Lebensdauer benutzt.

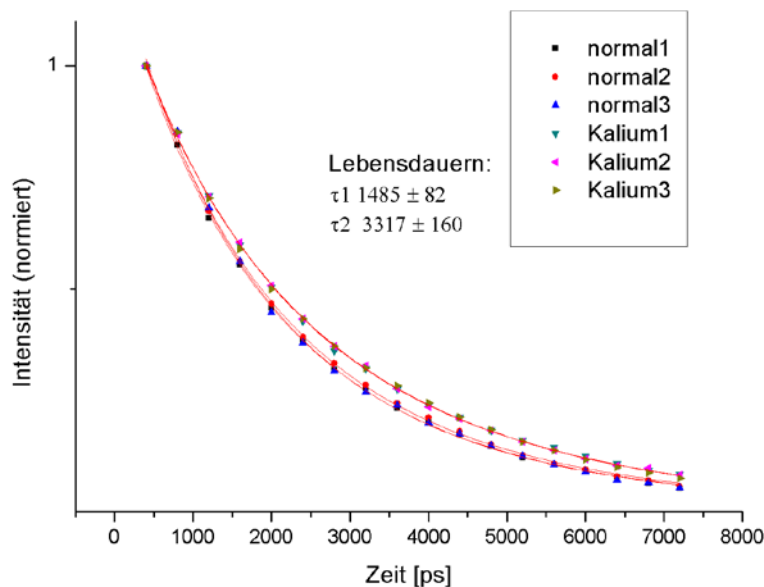


Abbildung 5-37 Beispiel für Lebensdauerkurven einer Stimulationsmessung (angefärbt mit OGB-1), freie Form des Indikators  $\tau_1 1485$  ps, gebundene Form  $\tau_2 3317$  ps.

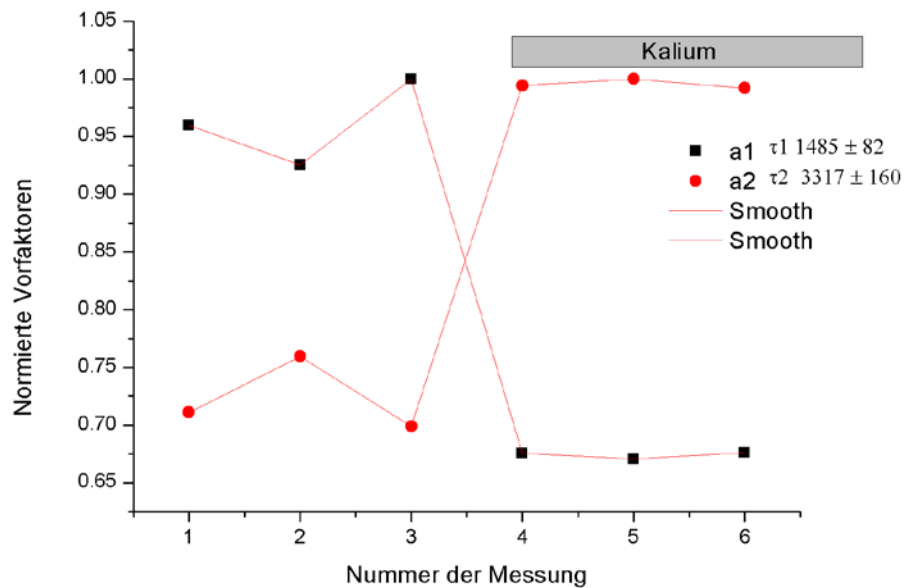


Abbildung 5-38 Änderung der Vorfaktoren zu Abbildung 5-37,  $a_1$  freie Form,  $a_2$  gebundene Form, jeweils auf den maximalen Wert des Vorfaktors normiert.

In Abbildung 5-39 ist ein prozentualer Vergleich zwischen und Lebensdauerwerten (monoexponentiell) und Intensitätswerten zu sehen, die aus den FLIM-Messdaten erzeugt wurden. Die Lebensdaueränderung bei Stimulation beträgt nur ca. 17 %, während sich die Intensität um 40% ändert. Dies ist vermutlich auf Unterschiede im Absorptionsquerschnitt der beiden Farbstoffformen zurückzuführen. Weiterhin ist zu sehen, dass Änderungen in der Intensitätskurve (ab Bild Nr. 22 in Abbildung 5-39) durch z.B. Photobleichung oder örtliche Veränderungen) keinen Einfluss auf die Höhe der Lebensdauern haben. Aus den Lebensdauerdaten kann man erkennen, dass die Calciumkonzentration bei der zweiten Kaliumstimulation auf den gleichen Wert wie bei der ersten ansteigt. Wenn man nur die Intensitätsdaten heranziehen würde, könnte man darauf schließen, dass die Calciumkonzentration auf einen geringeren Wert ansteigt. Hierbei zeigt sich ein weiterer Vorteil von FLIM-Auswertungen.

In Abbildung 5-40 sind 4 ausgewählte Fluoreszenzlebensdauerbilder eines Stimulationsexperimentes zu sehen. Die Lebensdaueränderungen von der nicht stimulierten Zelle zur stimulierten Zelle sind deutlich zu erkennen. Lokale Unterschiede innerhalb eines Bildes deuten auf eine erhöhte Calciumkonzentration hin.

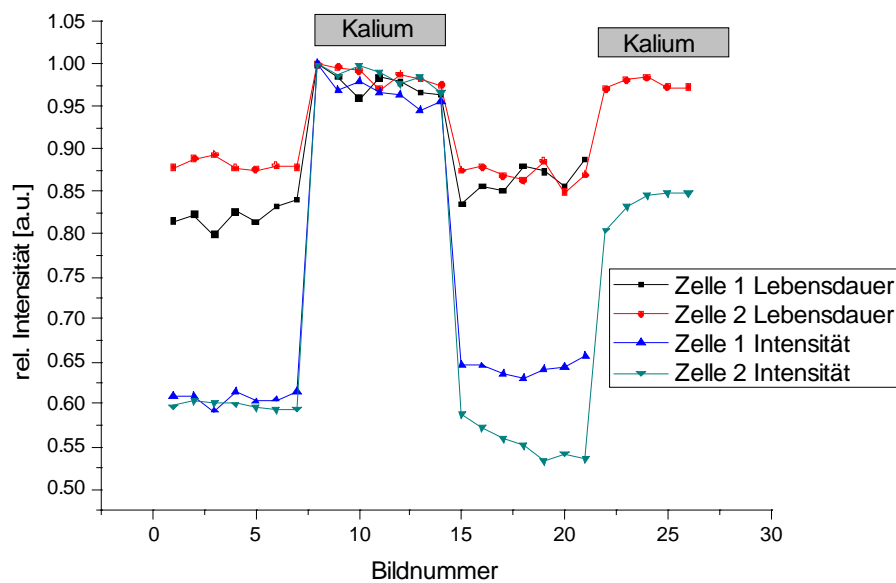


Abbildung 5-39: Stimulationsskurve: Vergleich zwischen der relativen Änderung der Intensität und der Lebensdauer (insgesamte Dauer der Verlaufskurve ca. 40 min).

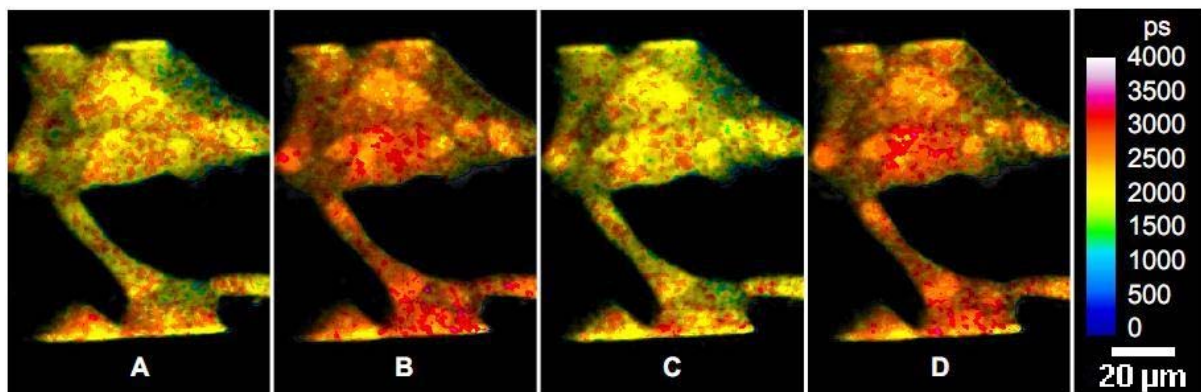
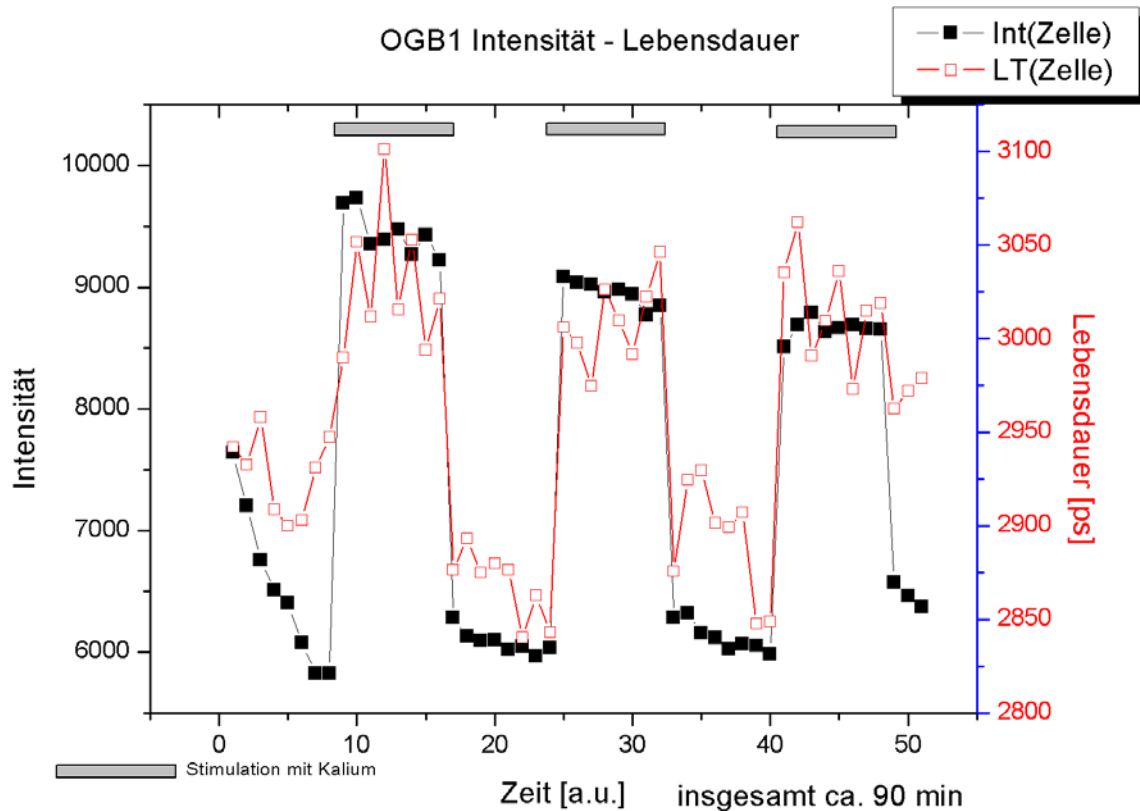


Abbildung 5-40 Anfärben mit OGB-1: Lebensdauerbilder von Zelle 2(MIN6): A und C nicht stimuliert; B und D, während Kaliumstimulation.

In Abbildung 5-41 ist ein weiteres Beispiel für ein Stimulationsexperiment mit Kalium an MIN6-Zellen gezeigt. Die prozentuale Änderung der Lebensdauer ist in diesem Experiment nicht so stark wie im obigen Beispiel, die Lebensdauer ist höher. Dies könnte auf unterschiedliche Calciumkonzentrationen von Zelle zu Zelle hinweisen. Weitere Experimente zeigten, dass die durchschnittliche Lebensdauer in MIN6-Zellen ohne Stimulation bei ca. 2800 ps liegt.

Die vorgestellten Experimente zeigen deutlich die Vorteile von OGB-1 gegenüber Fura-2. Die großen Unterschiede in den Lebensdauern erlauben es auch bei einer schnellen monoexponentiellen Auswertung kleine Änderungen in der Calciumkonzentration zu visualisieren.



**Abbildung 5-41 Stimulationsexperiment an MIN6-Zellen, Vergleich zwischen Fluoreszenzlebensdauer und Intensität**

Fura-2 hat dagegen eine höhere Grundfluoreszenz und eine Unempfindlichkeit gegenüber Photobleichung. Beide Indikatoren haben gemeinsam, dass keine direkte Übertragung von Lebensdauern zu Calciumkonzentrationen ohne weitere Kalibrierung oder komplexere Auswertung möglich ist. Die prozentualen Änderungen in der Lebensdauer sind bei beiden ähnlich, bei Fura-2 ist jedoch das Signal zu Rauschen-Verhältnis deutlicher kleiner. Die Experimente lassen daher die Schlussfolgerung zu, dass OGB-1 für Lebensdauermessungen in Pankreaszellen am besten geeignet ist (s. auch [132])

### 5.3 Anisotropiemessungen (Voruntersuchungen)

Um experimentelle Anisotropiedaten möglichst präzise zu messen, ist eine genaue Kenntnis aller störenden Einflussfaktoren nötig. Daher fanden einige Voruntersuchungen statt, bevor die eigentlichen 2C2P-Anisotropiemessungen im 90°-Aufbau durchgeführt wurden. Ziel war es dabei zum einen den Detektionsaufbau zu testen (s. Abbildung 4-7) und zum anderen den Einfluss von Lösemitteln, Streulicht etc. auf die zu ermittelnde Anisotropie  $r(0)$  zum Zeitpunkt  $t=0$  abschätzen zu können. Desweiteren wurden die Auswertemethoden getestet.

Alle Messungen am 2C2P-Mikroskop wurden mit linearer Polarisation (kollineare Anregung und Detektion, siehe Abschnitt 4.9.1) ausgeführt.

Im Rahmen der Mikroskopmessungen wurden die Detektoren auf mögliche Unterschiede der Antwortfunktionen und auf Polarisationslecks getestet. Aufgrund der kollinearen Anregung sollten die gemessenen Signalformen der zwei Detektoren bei horizontal linearer und vertikal linearer Anregung bis auf Intensitätsunterschiede identisch sein. Es konnten keine Unterschiede in den IRF und keine Polarisationslecks festgestellt werden.

#### *Einfluss der numerischen Apertur (NA)*

Bei der Verwendung von Objektiven hoher numerischer Apertur kommt es zu einer Depolarisation der Anregungs- und Emissionspolarisation [61,133]. Für die Anisotropiemessungen bedeutet eine Depolarisation eine Verkleinerung der Anisotropie, aus der man falsche Rückschlüsse auf die Tensorelemente ziehen könnte.

In Abbildung 5-42 sind die gemessenen Zweiphotonen-Anfangsanisotropien (zwei Messungen) von Rhodamin 6G in Ethanol für Objektive mit verschiedener numerischer Apertur (verschiedene Öffnungswinkel) dargestellt. Nach den Gleichungen von Fisz [134,135] und Axelrod [133] wurde die zu erwartende Anisotropie für einen bestimmten Öffnungswinkel berechnet. Es wurde angenommen, dass die maximale Zweiphotonen-Anisotropie von Rhodamin 6G in polaren Lösemitteln bei 800 nm  $r=0.49$  beträgt [64].

Die Abweichungen der Anfangsanisotropien der unabhängigen Messungen sind stark, es ist jedoch ein Trend zu einer signifikanten Verringerung mit steigendem Öffnungswinkel zu erkennen. Der Verlauf der Verringerung liegt nahe der berechneten Kurve. Kleine Abweichungen vom Trend aufgrund nicht perfekt parallel eingekoppelter Strahlen sind nicht auszuschließen. Die Abweichung von der Berechnung bei kleineren Öffnungswinkeln ist möglicherweise auf intramolekulare Energieübertragung oder zu hohe Farbstoffkonzentration zu-

rückzuführen. Fisz zufolge ist bis zu einem Öffnungswinkel von  $20^\circ$  keine signifikante Verringerung der Anisotropie feststellbar. Im 2C2P-Experiment wurde daher als Kompromiss zwischen kleinem Öffnungswinkel (schlechtes Signal zu Rauschen-Verhältnis) und Verringerung der Anisotropie ein Winkel von ca.  $30^\circ$  gewählt (Anregung: 0.3 NA, Luft-Objektiv, Emission: 30 mm Quarzsammellinse). Die Verringerung der Anisotropie beträgt daher nur wenige Prozent, d.h. der Einfluss der NA kann in den 2C2P-Messungen vernachlässigt werden.

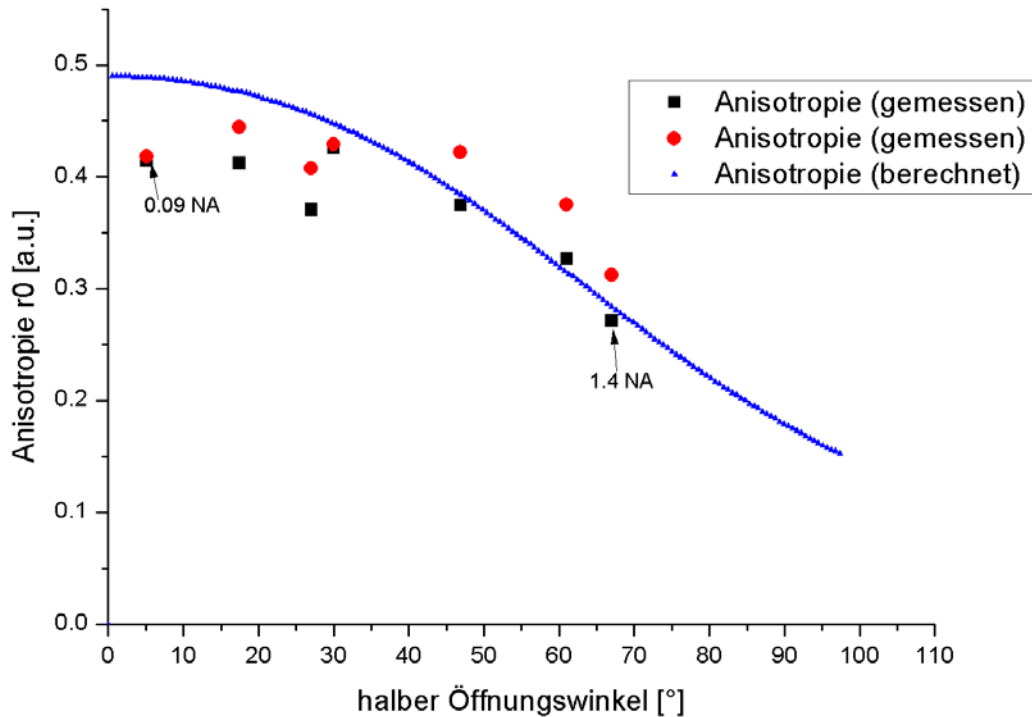


Abbildung 5-42 Vergleich zwischen zwei gemessenen Anfangsanisotropien  $r(0)$  (100  $\mu\text{mol/L}$  Rhodamin 6G in Ethanol, bei 800 nm, rot und schwarz) und berechneten Anfangsanisotropien  $r_0$  nach [134]; für  $r_0(0^\circ)$  wurde 0.49 gesetzt [64]).

Die Gleichungen, die Abhängigkeit der Anfangsanisotropie vom halben Öffnungswinkel  $\alpha_0$  beschreiben, sind nach Fisz mit sphärischen Tensoren beschrieben worden [134]. Hier sollen nur die Formeln genannt werden, mit denen man durch entsprechendes Einsetzen des halben Öffnungswinkels  $\alpha_0$  die Anisotropie berechnen kann:

$$r_{NA}(\alpha_0) = r \cdot \frac{R_2(\alpha_0)Q_2(\alpha_0)}{1 + \frac{1}{5}(R_0(\alpha_0)Q_0(\alpha_0)) - R_2(\alpha_0)Q_2(\alpha_0)} \quad (5.1)$$

$$Q_0(\alpha_0) = \frac{1}{2}(\cos(\alpha_0) - \cos^3(\alpha_0))/(1 - \cos(\alpha_0)) \quad (5.2)$$

$$Q_2(\alpha_0) = \frac{1}{12}(7 - 3\cos(\alpha_0) - 3\cos^2(\alpha_0) - 3\cos^3(\alpha_0))/(1 - \cos(\alpha_0)) \quad (5.3)$$

$$R_0(\alpha_0) = \frac{1}{2}(\cos(\alpha_0) - \cos^3(\alpha_0))/(1 - \cos(\alpha_0)) \quad (5.4)$$

$$R_2(\alpha_0) = \frac{1}{12}(7 - 3\cos(\alpha_0) - 3\cos^2(\alpha_0) - 3\cos^3(\alpha_0))/(1 - \cos(\alpha_0)) \quad (5.5)$$

$R_0/R_2$  und  $Q_0/Q_2$  sind Transformationskoeffizienten für die Anregung (R) und Emission (Q), die sich aus der theoretischen Behandlung von fokussiertem Licht in der Formulierung mit sphärischen Tensoren ergeben. Bei kollinearer Anregung und Emission (Mikroskop) sind sie vom gleichen Winkel abhängig ( $\alpha_0$ ). Für  $\alpha_0$  gegen Null geht die gemessene Anisotropie  $r_{NA}$  gegen  $r$ , d.h. der limitierenden Anisotropie für den entsprechenden Übergang (0.4, 0.571 etc.).



#### 5.4 Polarisationabhängigkeit der 2C2P-Absorption

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zweifarben-Zweiphotonen-Anisotropie-Experimente präsentiert. Alle Messungen wurden bei Wellenlängen von 800 und 400 nm durchgeführt, die bei 2C2P energetisch äquivalent zu einem 266 nm Photon sind. Untersucht wurde die Anisotropie der Fluoreszenz der Moleküle *para*-terphenyl (PTP), 2,5-Diphenyl-1,3,4-oxadiazol (PPD) und Indol bei verschiedenen Polarisationen. Als Lösemittel wurden Cyclohexan und Paraffin (Mineralöl, Nujol) verwendet. Die Viskosität des verwendeten Mineralöls liegt laut Hersteller bei ca. 36 mPas (zum Vergleich Wasser und Cyclohexan 1 mPas). Die Konzentrationen von PTP und PPD waren 500  $\mu\text{mol/L}$  in 60 % Paraffin/40% Cyclohexan und für Indol wurde eine Konzentration von 2.5 mmol/L in Mineralöl angesetzt.

Für die 2C2P-Anisotropie-Messungen wurden die Leistungen des 400 nm und 800 nm-Strahls so optimiert, dass minimales Hintergrundsignal von der TrPE mit 800 nm bzw. der TPE mit 400 nm erreicht wurde. Der Hintergrund betrug ca. 3% des eigentlichen 2C2P-Signals und wurde bei daher bei der Auswertung, wenn nicht explizit erwähnt, nicht berücksichtigt. Die Leistungen beider Anregungsstrahlen wurden vor und während der Messungen ständig überwacht. Zusätzlich wurde nach jedem Verstellen der  $\lambda$ -Platten die Anregungsleistung mit einem Powermeter überprüft. Alle Intensitätsdaten wurden mit der höchsten Zeitauflösung (4 ps) des TCSPC-Systems gemessen.

Die zu messenden Parameter sind die Anfangs-Anisotropien  $r(0)$  und die totalen Intensitäten bei verschiedenen Polarisationen zum Zeitpunkt  $t=0$ . Aus ihnen werden letztendlich die M-Parameter berechnet. Die Anfangsanisotropie sollte theoretisch unabhängig von der Viskosität des verwendeten Lösemittels sein. Jedoch sind bei kleinen Molekülen die Rotationskorrelationszeiten in Cyclohexan im Bereich unter 50 ps, so dass eine Depolarisation der Fluoreszenz innerhalb des Anstiegs der IRF erfolgt, wo nur wenige Photonen gezählt werden. Hier wirken sich Fehler im Fitting am stärksten aus. Es wurde daher mit eher viskoserer Lösemittelmischungen gearbeitet, da dort die Rotationskorrelationszeit länger ist. Für PTP und PPD wurde eine Mischung aus Cyclohexan und Paraffin gewählt. In reinem Paraffin kann es schnell zu thermischen (Blasenbildung) und nichtlinearen Effekten (Weißlicht-Erzeugung) kommen, so dass die Anregungsleistung zu stark erniedrigt werden muss.

Innerhalb des Messfensters (ca. 13 ns, Zeit zwischen zwei Anregungspulsen) erfolgt eine komplette Depolarisation der Fluoreszenz. Dies erlaubt eine genaue Einstellung der Empfindlichkeit der Detektoren (des G-Faktors) auf ca. 1 (manuelles Tailfitting durch Verschieben der Position der Detektorfläche) und damit ein ähnliches Signal zu Rauschen-Verhältnis in beiden

Kanälen. Indol hat als deutlich kleineres Molekül auch kleine Rotationskorrelationszeiten als PTP/PPD. Es wurde daher in reinem Mineralöl gelöst, um die Viskosität (d.h. Rotationszeit) zu erhöhen. Die Anregungsleistung wurde entsprechend korrigiert, um thermische Effekte zu vermeiden.

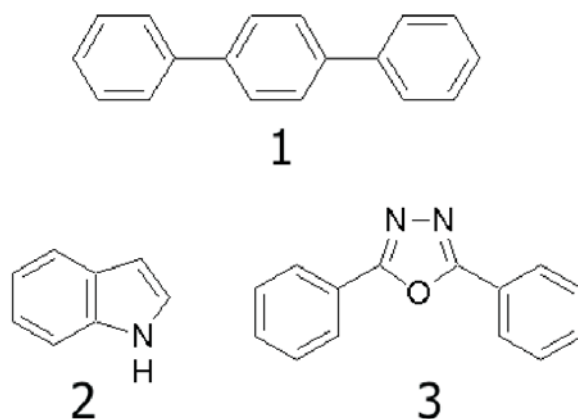


Abbildung 5-43 Untersuchte Moleküle: 1 Para-terphenyl (PTP), 2 Indol , 3 2,5-Diphenyl-1,3,4-oxadiazol (PPD).

#### 5.4.1 2C2P-Absorption

Wie oben beschrieben, können zwei oder mehrere Photonen unterschiedlicher Wellenlänge simultan von Molekülen absorbiert werden. Erste Ergebnisse zur Intensität der 2C2P-Absorption bei verschiedenen polarisierten Photonen wurden veröffentlicht [10], waren aber nicht optimiert und wurden zum Teil mit schlechtem Polarisationsgrad durchgeführt.

Eines der einfachsten Experimente, was sich nur mit zwei Photonen unterschiedlicher Polarisation durchführen lässt, ist ein Experiment mit linear polarisierten Photonen. Dabei wird die totale 2C2P-induzierte Fluoreszenzintensität einer Probe bei unterschiedlichen Ausrichtungen der Polarisationsvektoren gemessen. Die Intensität wird durch

$$I(t) = A + B \cos^2(\theta) \quad (5.6)$$

beschrieben [42]. Dabei ist  $\theta$  der Winkel zwischen den beiden Polarisationsvektoren. Ein Winkel von  $0^\circ$  entspricht linear parallel polarisierten Strahlen,  $90^\circ$  senkrecht zueinander ausgerichteten Polarisationsvektoren. Die Größen der Variablen  $A$  und  $B$  hängen neben der Quantenausbeute, der Anregungsintensität und der Detektionseffizienz des Systems auch von der Wellenlänge und der Symmetrie des angeregten Zustandes (d.h. auch des Zweiphotonenparameters) ab.  $A$  und  $B$  sind Linearkombinationen der von McClain eingeführten Zweiphotonenparameter  $\delta_F$ ,  $\delta_G$ ,  $\delta_H$  (siehe Abschnitt 2.5):

$$I(t) = (\delta_F + 4\delta_G - \delta_H) + (3\delta_F - 2\delta_G + 3\delta_H)\cos^2(\theta) \quad (5.7)$$

$A$  muss per Definition immer positiv sein, das gleiche gilt für die Summe  $A+B$ .  $B$  kann dagegen negativ oder positiv sein. Ein positiver Wert von  $B$  bedeutet, dass parallel polarisierte Photonen stärker absorbiert werden.

Das Resultat eines solchen Experimentes ist in Abbildung 5-44 zu sehen. Es wurde an PTP in Cyclohexan/Paraffin am 90°-Aufbau durchgeführt. Dabei wurde die Summe der Counts in beiden Kanälen als Maß für die Intensität genommen. Die Anisotropie der Fluoreszenz kann in diesem Fall vernachlässigt werden, da sie nur einen geringen Einfluss auf die Gesamtintensität hat. Die Fluoreszenz, die durch Einfarben-Zweiphotonenanregung und Dreiphotonenanregung verursacht wird, wurde jeweils von der Gesamtintensität abgezogen. Die Polarisation des roten Strahls wurde konstant gelassen, die des blauen in 5°-Schritten gedreht. Durch ein solches Experimentes lässt sich der angeregte Zustand nicht vollständig charakterisieren, die stärkere Absorption von parallel polarisiertem Photon weist aber auf einen Tensor mit dominierenden Diagonalelementen hin. Der Verlauf der Kurve entspricht der von Lakowicz für 2C2P-Anregung von PTP in Cyclohexan bei 253 nm [9]. Die Intensitäten für senkrecht polarisierte Photonen liegen bei den Messungen in dieser Arbeit ca. drei Prozentpunkte höher, was vermutlich an der Benutzung einer anderen Wellenlänge liegt.

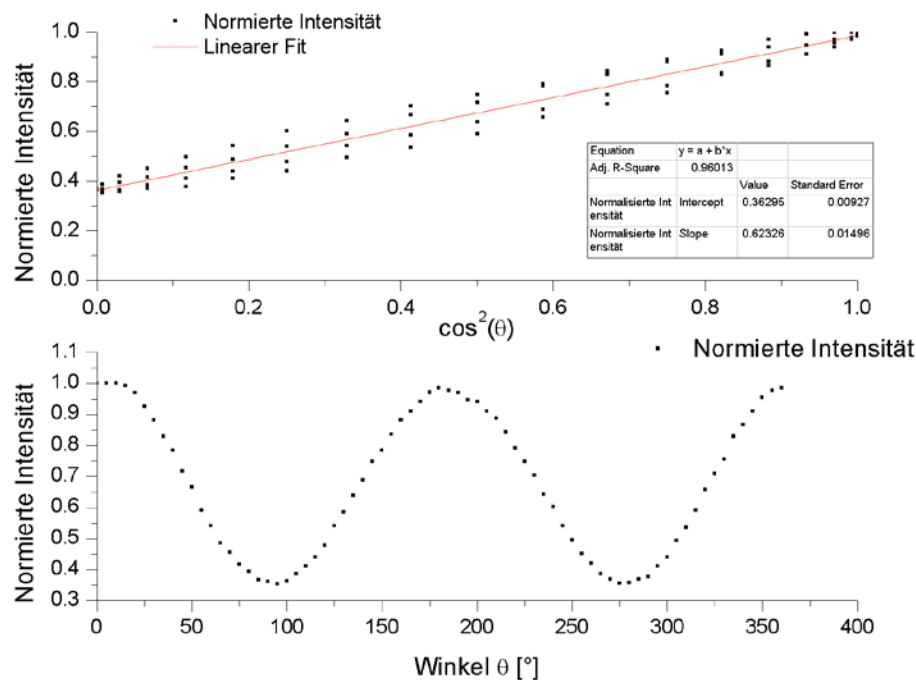


Abbildung 5-44 Polarisationsexperiment mit zwei linear polarisierten Photonen an PTP in Cyclohexan in Paraffin, oben: linearisierte Darstellung und linearer Fit, Achsenabschnitt  $0.36 \pm 0.01$ , Steigung  $0.62 \pm 0.01$ , unten: Winkel-Darstellung.

Nicht zeitaufgelöste Messungen sind experimentell weniger aufwendig als zeitaufgelöste Messungen. Durch solche Messungen lassen sich, wie in Abschnitt 2.5 ausgeführt, einige Informationen über die Symmetrie des angeregten Zustands gewinnen. Daher wurden für PTP in Cyclohexan Messungen der totalen Fluoreszenzintensität ohne Einfluss von Anisotropie bei verschiedenen polarisierten Anregungsphotonen mit dem ICCD-Kamera-System (Technik s. Abschnitt 4.5) durchgeführt. In Abbildung 5-45 sind die Intensitäten für vier verschiedene Polarisationskombinationen aufgeführt (linear parallel, linear senkrecht, zirkular gleichsinning (circular corotierend) und zirkular gegensinning (circular conrotierend)). Da  $\Omega$  in diesem Fall deutlich unter dem Wert von 1.5 liegt, ist der angeregte Zustand totalsymmetrisch. Die Summen der verschiedenen Intensitäten sollten nach Gleichung 2.45 ( $I_{lin\ par} + I_{lin\ per} = I_{circ\ co} + I_{circ\ con}$ ) äquivalent sein. Hier ist eine kleine Abweichung von drei Prozentpunkten feststellbar, was möglicherweise auf eine systematische Depolarisation der Anregungsstrahlen zurückzuführen ist.

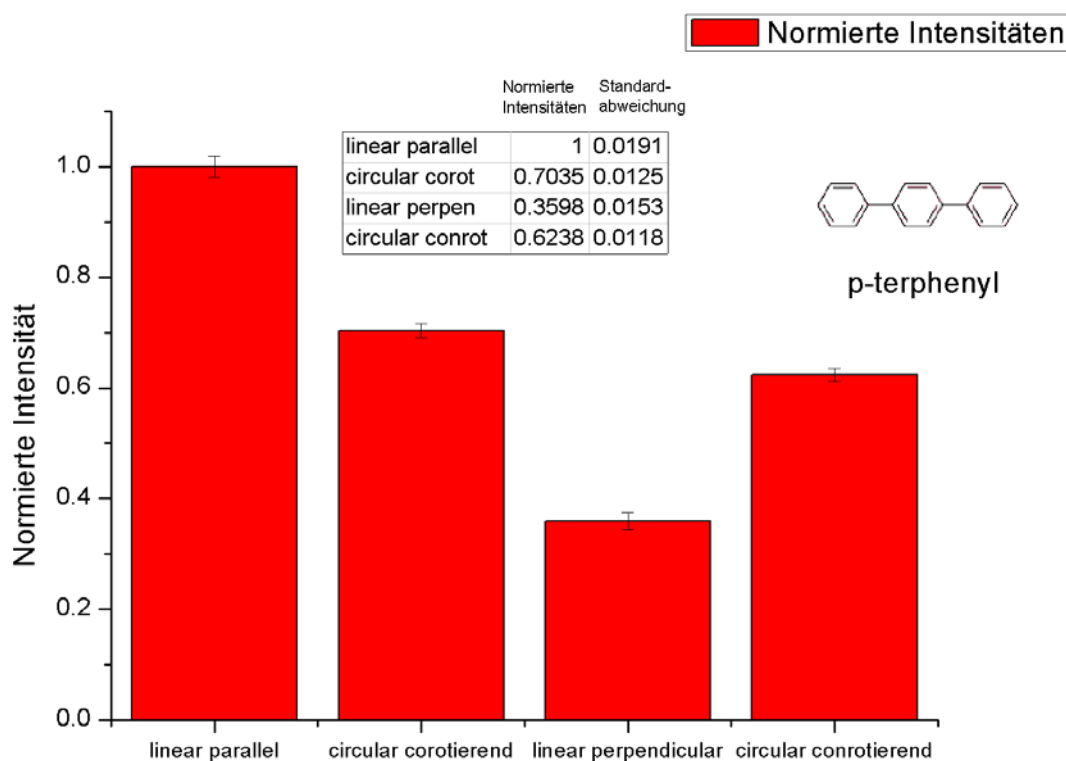


Abbildung 5-45 Normierte Intensitäten für die 2C2P-Absorption von PTP in Cyclohexan mit verschiedenen polarisierten Photonen (400 nm und 800 nm), die Hintergrund-Fluoreszenz von TPE und TrPE wurde jeweils abgezogen (s. auch [57]).

### Berechnung der McClain-Parameter

Analog McClain [41] lassen durch Auftragung der oben gemessenen Intensitäten in einem dreidimensionalen Koordinaten-System, die Parameter, die für die weitere Bestimmung der Symmetrie des Übergangs entscheidend sind, bestimmen. In Abbildung 5-46 ist diese Art der Auftragung gezeigt: Die Eckpunkte stellen die Polarisationskombination dar, die normierten Intensitäten wurden in der Z-Achse aufgetragen. Die Fläche wird über folgende Gleichung beschrieben:

$$I(t) = (-\delta_F + 4\delta_G - \delta_H) + (-\delta_F - \delta_G + 4\delta_H)|\lambda \cdot \mu^*|^2 + (4\delta_F - \delta_G - \delta_H)|\lambda \cdot \mu|^2 \quad (5.8)$$

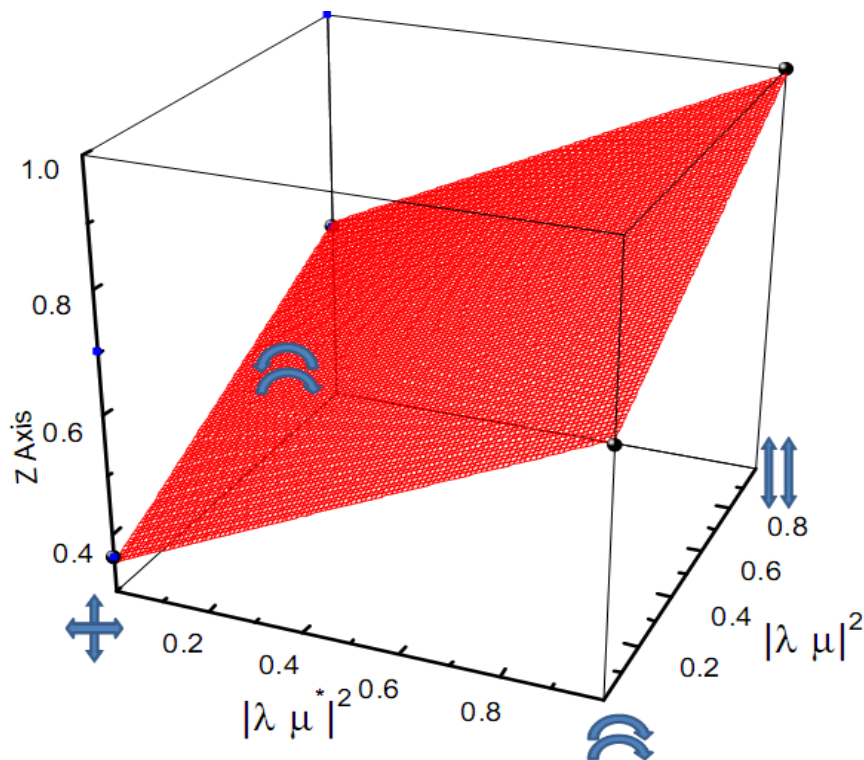


Abbildung 5-46 Relative 2C2P-Absorption PTP in Cyclohexan, schwarze Punkte: normierte Intensitätswerte, rote Fläche nicht-linearer Flächenfit, Darstellung gemäß McClain [41], die Achsen x ( $|\lambda \cdot \mu^*|^2$ ) und y ( $|\lambda \cdot \mu|^2$ ) sind die jeweiligen Produkte der Anregungspolarisationen.

Über einen Flächen-Fit (rot) erhält man drei Werte, aus denen sich die  $\delta_i$ -Parameter berechnen lassen. Die erhaltenen Parameter sind  $\delta_F = 1.55 \pm 0.07$ ,  $\delta_G = 1.69 \pm 0.08$ ,  $\delta_H = 1.70 \pm 0.08$ . Da  $\delta_F$  nicht Null ist, lässt dies auf einen totalsymmetrischen angeregten Zustand schließen. Die Differenz von  $\delta_G$  und  $\delta_H$  ist nahe 0, also ist der Tensor nahezu symmetrisch. Hier ist anzumerken, dass  $(\delta_G - \delta_H)$  zwar leicht negativ ist, was aufgrund der Definition der Parameter nicht möglich ist; die minimale Abweichung liegt jedoch innerhalb der Fehlergrenzen.

### 5.4.2 2C2P-Anisotropiemessungen

#### PTP

Aus den oben beschriebenen Messungen und Auswertungen, die nach dem Muster von McClain durchgeführt wurden, lassen sich erste Rückschlüsse auf die Symmetrie ziehen. Um eine genauere Bestimmung der Symmetrie des angeregten Zustands, der Tensorformen und Tensorelemente machen zu können, wurden 2C2P-Anisotropiemessungen durchgeführt.

An die Daten für die Polarisations-Kombinationen (HH, RR/LL und RL/LR) wurden die oben beschriebenen Anisotropiefunktionen (s. Abschnitt 4.9.2) angepasst. An VHx und VHy wurde wie beschrieben eine einfache biexponentielle Funktion angepasst. In Abbildung 5-46 sind die Daten für die Kanäle HHy und HHx (d.h.  $I_{//}$  und  $I_{\perp}$ ) und die Fit-Kurven dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind die reduzierten Residuen gezeigt, die bei Übereinstimmung des Fits mit den Daten symmetrisch um Null variieren sollen. Sie zeigen eine hervorragende Übereinstimmung des Fits mit den Daten an. Der  $\chi_R^2$ -Wert liegt nahe 1 was ebenfalls eine Indikation für einen sehr guten Fit ist. Im Bereich des Anstiegs der Kurven ist eine minimale Abweichung der Residuen zu sehen. Diese ist möglicherweise auf Streulicht zurückzuführen, wirkt sich jedoch nur unwesentlich auf die zu ermittelnden Parameter aus.

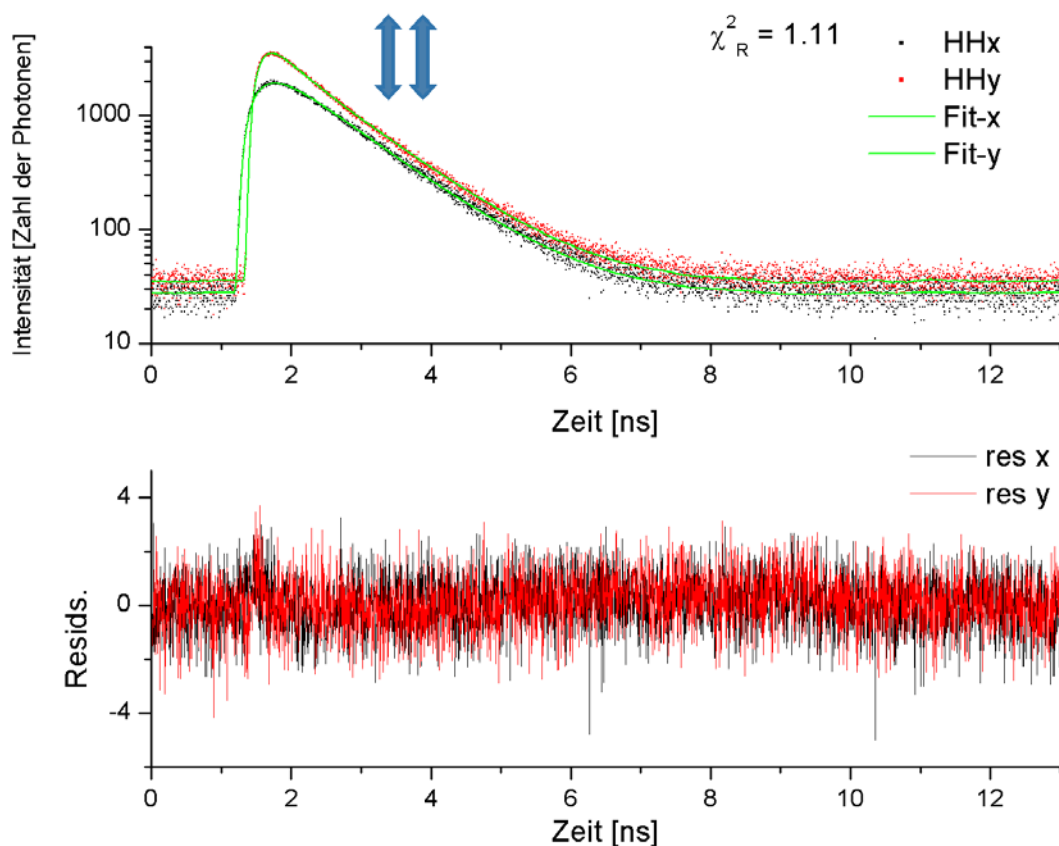


Abbildung 5-47 TCSPC-Kurven für HHx und HHy für PTP, Fit-Kurven in grün, reduzierte Residuen sind im unteren Bereich dargestellt, Anregungspuls bei 1480 ps, Anregungsleistung 180 mW rot, blau 8.6 mW.

Die Daten und Fits für alle Arten der Polarisationskombinationen sind in Abbildung 5-48 gezeigt. Die Anregungspolarisationen sind hier als Kombination zweier Pfeile dargestellt. Alle Fits zeigen eine exzellente Übereinstimmung mit den Daten (die Residuen wurden aus Übersichtlichkeitsgründen weggelassen).

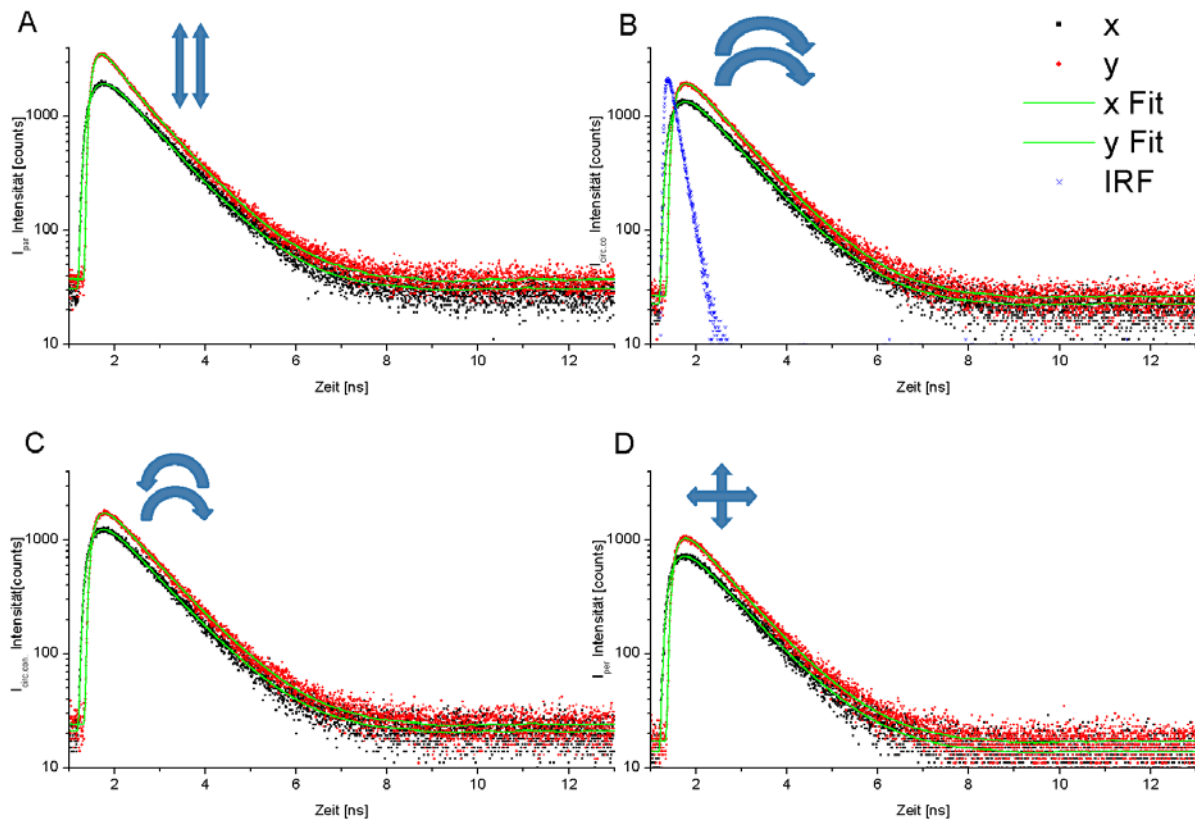


Abbildung 5-48 TSCPC-Abklingkurven für ein komplettes 2C2P-Polarisationsexperiment an PTP, Anregungsleistung 180 mW rot, blau 8.6 mW, IRF in blau dargestellt, Anregungspolarisationen sind in Form von Pfeilen dargestellt.

Aus den Fits erhält man die Anfangsanisotropien, die totalen Intensitäten, die Fluoreszenzlebensdauer und die Rotationskorrelationszeit(en). Diese sind in Tabelle 5-1 aufgeführt. Da PTP als prolater Ellipsoid angenähert werden kann, werden die Intensitätsdaten ausreichend durch eine Rotationskorrelationszeit beschrieben. Die exakte Größe von  $\tau_{rot}$  war nicht Schwerpunkt dieser Messungen, sie liegt jedoch im erwarteten Bereich (s. auch [136]). Die Fluoreszenzlebensdauer ist mit knapp unter 1 ns ebenfalls genau im Bereich der Literaturwerte [137].

Tabelle 5-1 Daten für PTP bei 2C2P in 60 % Paraffin 40 % Cyclohexan und die Standardabweichung ( ) von n=4 unabhängigen Messungen für die Polarisationskombinationen.

Polarisationen	HH	RR	RL	VH
Totale Intensitäten (t=0), normiert	1 (0.002)	0.69 (0.007)	0.61 (0.003)	0.37 (0.006)
Lebensdauer $\tau_f$ (Mittelwert aller Pol.)	968 (10) ps			
Anisotropie r(0)	0.41 (0.005)	- 0.19 (0.01)	- 0.19 (0.01)	0.20 (0.005)
Rotationskorrelationszeit $\tau_{rot}$ (Mittelwert aller Pol.)	240 (15) ps			

Die spätere Analyse der M-Parameter und der sich daraus ergebenden Tensoren vereinfacht sich, wenn man die Konformationen des Moleküls im Grundzustand zu kennt. In Lösung gibt es zwei Formen niedriger Energie, eine helikale ( $D_2$ ) und eine verdrehte Form ( $C_{2h}$ ), welche die stabilste Form ist [138,139]. Rechnungen mit Gaussian® zeigen, dass die niedrigsten Singulett-Zustände der  $D_2$ -Konformation zu hoch liegen, um mit 266 nm (400 nm + 800 nm) angeregt zu werden. Es ist daher davon auszugehen, dass sich hauptsächlich die  $C_{2h}$ -Konformation im angeregten Zustand befindet.

Tabelle 5-2 Ermittelte M-Parameter nach „reconvolutional Fitting“ für PTP in 40%-Cyclohexan-60%-Paraffin, normiert auf  $M_0(2,2)$  Standardabweichung, Werte aus vier Messungen.

M-Parameter (normiert auf $M_0(2,2)$ )	Wert	Standardabweichung
$M_0(0,0)$	1.06	0.01
$M_0(1,1)$	-0.10	0.013
$M_0(2,2)$	1	0.01
$M_2(2,2)$	1.12	0.07
$M_2(0,2)$	1.59	0.03
$M_2(1,1)$	0.29	0.05
$M_2(1,2)$	-0.38	0.08

Das Verhältnis der Tensorelemente lässt sich nur durch die M-Parameter ermitteln. Bei PTP wurde der Fehler des Fits als vernachlässigbar gegenüber einer wiederholten Einzelmessung eingeschätzt und daher die M-Parameter für verschiedene Kombinationen der einzelnen Polarisationsmessungen berechnet und der Mittelwert gebildet. Alle Parameter wurden auf  $M_0(2,2)$  normiert. Sie sind in Tabelle 5-2 dargestellt.



Es ergibt sich, dass in der Beschreibung der Fluoreszenzanisotropie vier Parameter dominieren ( $M_0(0,0)$ ,  $M_0(2,2)$ ,  $M_2(2,2)$ ,  $M_2(0,2)$ ), während das Verhältnis der anderen Parameter zu  $M_0(2,2)$  deutlich kleiner ist.

Es fällt jedoch auf, dass im Gegensatz zur Theorie der Parameter  $M_0(1,1)$  einen negativen Wert aufweist. Per Definition ist dies nicht möglich, da es ein isotroper Parameter ist. Durch Fitting-Fehler oder Abweichungen einer Einzelmessung lässt sich dies nicht erklären. Es gibt mehrere Möglichkeiten zur  $M_0(1,1)$ -Ermittlung. Berechnet man  $M_0(1,1)$  direkt aus den Gesamtintensitäten mit den Gleichungen 2.44 und 2.45, dann ergibt sich ein kleiner positiver Wert von 0.06. Es lässt sich also schließen, dass dieser Parameter nahe Null ist und dass es systematische Abweichungen gibt, die die Größe der kleineren Parameter beeinflussen.

Ein Vergleich mit den normierten Beispielwerten für M-Parameter von Tabelle 2-6 zeigt, dass der Zweiphotonentensor vermutlich durch ein einziges Element dominiert wird. Auch die vier Anisotropiewerte unterstützen diese Hypothese. Für einen Tensor, der durch ein einziges Element dominiert wird und ein Emissionsdipolmoment parallel zur Hauptachse des Tensors (dominierendes Element) hat, ergeben sich Anisotropien von 0.571 (linear Pol.), -0.28 (zirk. gleichsinnig Pol.), -0.28 (zirk. gegens.), 0.28 (senkrecht. Pol.)

Aus den Intensitätsverhältnissen lässt sich schließen, dass der Übergang in einen totalsymmetrischen Zustand erfolgt. Ähnliche Messwerte für  $\Omega$  (RR/HH) wurden von Drucker gemessen [5]. Der allgemeine Tensor für  $C_{2h}$  (A-Symmetrie) ist nach McClain:

$$A_g \leftarrow A_g = \begin{bmatrix} S_1 & S_4 & 0 \\ S_5 & S_2 & 0 \\ 0 & 0 & S_3 \end{bmatrix} \quad (5.9)$$

Bei vielen aromatischen Molekülen ist ein Beitrag von Übergängen die senkrecht zur Molekülebene polarisiert sind relativ gering. Man kann also davon ausgehen, dass der Tensor nahezu zweidimensional ist.

Im Vergleich zu den Literaturwerten (PTP in Triacetin bei niedriger Temperatur:  $r_{lin}(0)=0.55$ , 2C2P bei 250 nm [9]) ist die gemessene lineare Anisotropie jedoch deutlich kleiner. Depolarisationen durch Objektive oder durch Sättigungseffekte können aufgrund der experimentellen Bedingungen vernachlässigt werden.

Bei zeitaufgelösten Messungen in der Zeitdomäne ist die ermittelte Anfangsanisotropie im Vergleich zu der Anisotropie in gefroren Medien oft geringer. Dieser Effekt wird in der Literatur sogenannten Librationen bzw. nicht aufgelösten „Fluktuationen in der Struktur der Mo-

leküle im Pikosekundenbereichen“ [70,136,140,141] zugeschrieben. Kleine resultierende Unsicherheiten in der Richtung der Dipolmomente führen zu Abweichung zwischen Theorie und Messung von bis zu 25 %. Dieser Effekt ist sowohl für Einphotonen-Messungen als auch bei Zweiphotonenmessungen beobachtbar [136] und betrifft auch Messungen bei denen die Antwortfunktion des Detektors deutlich kleiner (d.h. höhere Zeitauflösung) ist, als die des in dieser Arbeit verwendeten Detektors. Eine Möglichkeit diesen Effekt zu korrigieren, wurde von Ryderfors *et al.* [76] beschrieben, sie ist jedoch nur für oblate Rotoren anwendbar. Bei Zweiphotonenmessungen in Perylene wurde die Verringerung der Anisotropie zusätzlich einer Überlagerung von Zuständen mit  $A_g$ -Symmetrie (diagonaler Tensor) und  $B_g$ -Symmetrie (Diagonalelemente 0) zugeschrieben (Wan/Johnson in [35]). Oft wird die Diskrepanz zwischen Theorie und Messung durch Einführung von Parametern korrigiert [7].

Die generelle Interpretation des Zweiphotonentensor und des Fluoreszenzdipolmoments von PTP ändert sich durch diese Einschränkungen jedoch nicht. Anhand der Formeln im Anhang (siehe Beispielrechnung in Abschnitt 8.2) können unter vereinfachten Bedingungen (nur ein intermediärer Zustand statt Summierung über alle Zustände; Wellenlängen 400 nm und 800 nm, vereinfachte Symmetrie) für bestimmte Verhältnisse der Tensorelemente  $S_{ab}$  die M-Parameter, Intensitäten usw. berechnet werden. Ein Zweiphotonentensor dessen Ergebnisse und Anisotropiewerte am besten mit den gemessenen Daten übereinstimmen, könnte demnach folgendermaßen aussehen:

$$A_g \leftarrow A_g = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0.16 & -0.03 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (5.10)$$

Durch die Messungen lassen sich die Verhältnisse der Tensorelemente zueinander wiedergeben, jedoch nicht ob nun  $S_{xy}$  oder  $S_{yx}$  den Wert 0.16 annimmt. Im Rahmen der Theorie zählt nur die Asymmetrie des Tensors. In Tabelle 5-3 sind die berechneten totalen Intensitäten und Anisotropien für diesen Tensor aufgetragen. Dabei wurde angenommen, dass ein „falscher“ Winkel zwischen Emissionsmoment und Haupttensorachse von ca.  $27^\circ$  existiert, um den Einfluss der Librationen zu berücksichtigen.

Tabelle 5-3 Berechnete Intensitäten und Anisotropien für den Tensor in Gleichung 5.10 für verschiedene Polarisationskombination.

Polarisationen	HH	RR	RL	VH
Intensitäten	1	0.707	0.647	0.355
Anisotropien	0.40	-0.194	-0.201	0.193
$\Omega (RR/HH)$	0.70			

In Tabelle 5-4 sind die errechneten M-Parameter für den oben definierten Tensor aufgeführt. Die Übereinstimmung der dominierenden großen M-Parameter ( $M_0(0,0)$   $M_0(2,2)$   $M_2(0,2)$   $M_2(2,2)$ ) mit den experimentell ermittelten Werten ist gut. Die Parameter  $M_0(1,1)$ ,  $M_2(1,1)$  und  $M_2(1,2)$  sind nahezu null, wenn der Tensor symmetrisch ist, der Unterschied zu den experimentellen Werten ist daher auf systematischen Abweichungen in den Anregungspolarisationen zurückzuführen, die sich auf die kleineren Parameter umso stärker auswirken.

Tabelle 5-4 Errechnete M-Parameter nach für den Tensor in Gleichung 5.10.

M-Parameter (normiert auf $M_0(2,2)$ )	Wert
$M_0(0,0)$	1.00
$M_0(1,1)$	Ca. 0
$M_0(2,2)$	1
$M_2(2,2)$	1.15
$M_2(0,2)$	1.46
$M_2(1,1)$	Ca. 0
$M_2(1,2)$	Ca. 0

Die Energien der angeregten Zustände von PTP wurden in Zusammenarbeit mit Smolin und Vasyutinskii vom Ioffe-Institut, St. Petersburg für verschiedene Konformationen (Punktgruppen) von PTP im Vakuum gerechnet. In Abbildung 5-49 ist die Lage dieser Energien für die  $C_{2h}$ -Konformation aufgetragen:

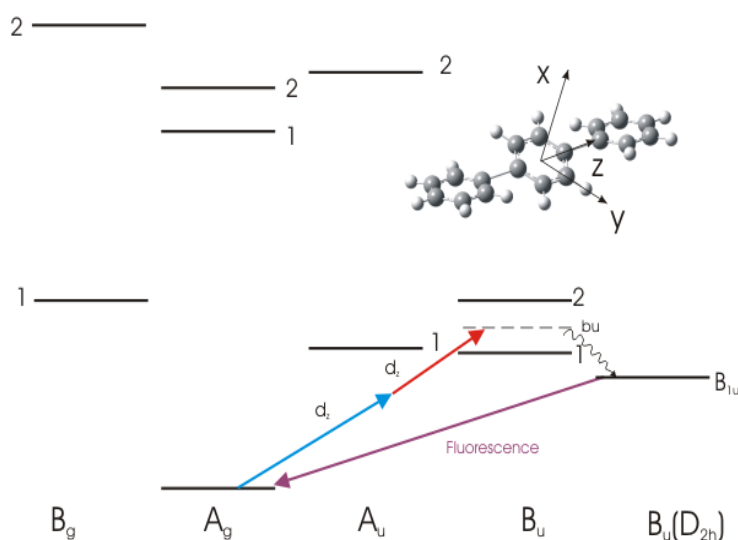


Abbildung 5-49 Energiediagramm für die angeregten Übergänge in PTP, die  $C_{2h}$  von PTP ist als Einfügung mit den molekularen Achsen gezeigt.

Es ergibt sich, dass energetische Lage der angeregten totalsymmetrischen Zustände deutlich höher ist (Absorption  $< 200$  nm), die Anregung bei 266 nm daher symmetrieverboten sein sollte. Bei PTP muss deshalb wie bei vielen aromatischen Molekülen eine vibronischen Kopplung angenommen werden (Herzberg-Teller-Kopplung) [72]: Eine  $b_u$ -Schwingung koppelt mit dem niedrigsten elektronischen Zustand  $B_u$ , woraus ein erlaubter Zustand mit  $A_g$ -Symmetrie resultiert. Den größten Beitrag zum Zweiphotonenübergang leistet ein  $A_u$ -Zustand, für den sich bei den Gaussian®-Rechnungen ein großes Dipolmoment ergibt, das entlang der langen Achse des Moleküls polarisiert ist. Nach der Anregung erfolgt eine schnelle Relaxation in den niedrigsten angeregten Zustand ( $B_{1u}$ ), hier hat PTP eine planare Geometrie ( $D_{2h}$ ). Aus diesem Zustand erfolgt die Emission.

### PPD

PPD ist ein Laserfarbstoff, der wie sein Derivat PPO (2,5-Diphenyloxazol) und PTP vielfach als Szintillator (ein Stoff, der durch ionisierende Strahlung zur Fluoreszenz angeregt wird) benutzt wird. Sein Emissionsmaximum liegt bei ca. 350 nm. Er gehört zu den Fluorophoren an denen Lakowicz erste 2C2P-Absorptionen mit Pikosekundenpulsenn demonstrierte [54].

Bei den 2C2P-Anisotropiedaten wurde bei der Auswertung genauso wie bei den PTP-Daten vorgegangen. Das beste Modell für die Beschreibung der Daten ist auch hier wieder ein biexponentieller Fit. Die Daten und die entsprechenden Fit-Funktionen sind in den folgenden Abbildungen aufgeführt.

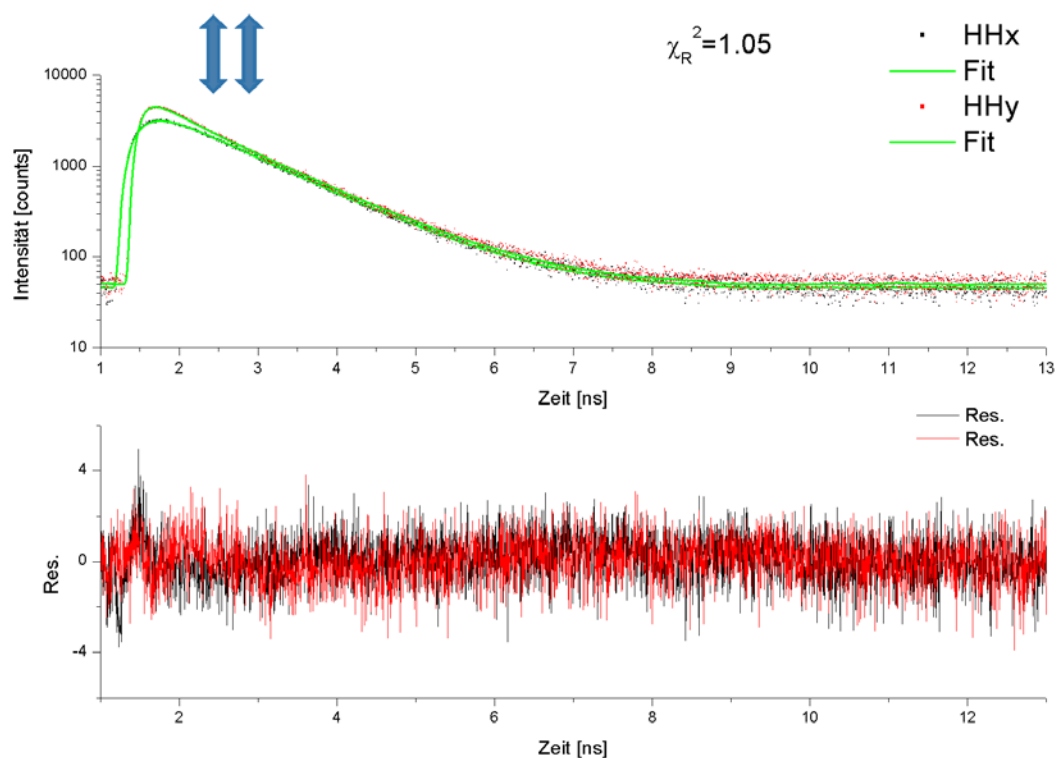


Abbildung 5-50 TCSPC-Kurven für HHx und HHy für PPD, Fit-Kurven in grün, reduzierte Residuen im unteren Teil der Abbildung.

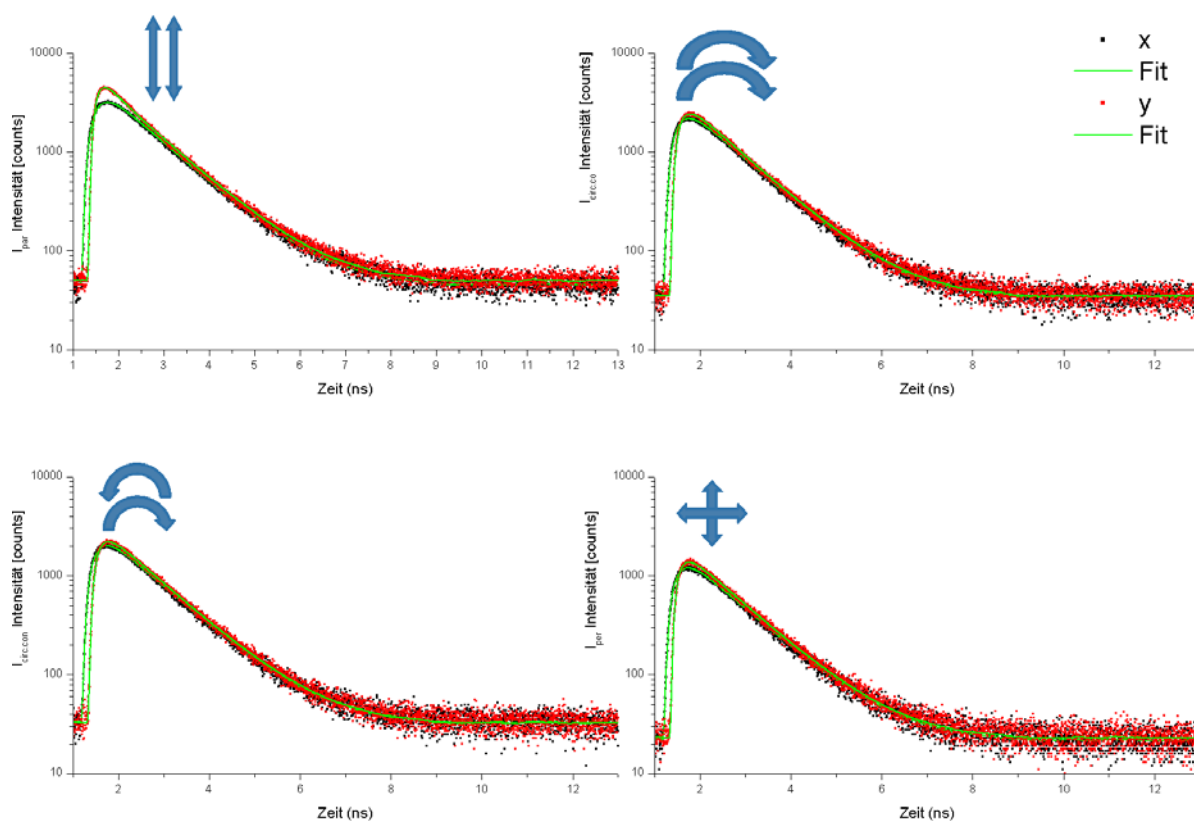


Abbildung 5-51 TCSPC-Abklingkurven für ein komplettes 2C2P-Polarisationsexperiment an PPD, rot 181 mW, blau 10 mW, Anregungspolarisationen sind in Form von Pfeilen dargestellt.

Für PPD ergeben sich ähnliche Intensitäts- und Anisotropieverhältnisse wie bei PTP. Spektroskopische Daten und Symmetrieuntersuchungen zu PPD sind kaum vorhanden. Lakowicz *et al.* [54] maßen bei PPD in Ethanol eine Anisotropie von 0.55 (2C2P-Anregung bei 380&760 nm).

Tabelle 5-5 Daten für PPD in 40 % Cyclohexan/ 60 % Paraffin, Standardabweichung in Klammern

Polarisationen	HH	RR	RL	VH
Totale Intensitäten ( $t=0$ ), normiert	1 (0.004)	0.35 (0.005)	0.68 (0.004)	0.61 (0.004)
Lebensdauer $\tau_f$ (Mittelwert aller Pol.)	1052 (7) ps			
Anisotropie $r(0)$	0.46 (0.005)	- 0.19 (0.007)	- 0.19 (0.01)	0.18 (0.01)
Rotationskorrelationszeit $\tau_{rot}$ (Mittelwert aller Pol.)	160 (28) ps			

Die Verhältnisse der M-Parameter ergeben ein ähnliches Bild wie bei PTP: Vier dominierende Parameter und drei deutliche kleinere Parameter. Es ist daher davon auszugehen, dass auch hier ein Übergang in einen totalsymmetrischen Zustand stattfindet und der Tensor durch ein einziges Element dominiert wird. Das Emissionsdipolmoment ist nahezu parallel zu dieser Haupttensorachse. Auch hier spielen die oben beschriebenen Librationen und systematischen Abweichungen eine Rolle.

Tabelle 5-6 Ermittelte M-Parameter nach „reconvolutional Fitting“ für PPD in 40%-Cyclohexan-60%-Paraffin, normiert, Standardabweichung des Fits.

M-Parameter (normiert auf $M_0(2,2)$ )	Wert	Standardabweichung
$M_0(0,0)$	1.069	0.006
$M_0(1,1)$	-0.09	0.007
$M_0(2,2)$	1	0.005
$M_2(2,2)$	1.07	0.04
$M_2(0,2)$	1.81	0.03
$M_2(1,1)$	0.46	0.10
$M_2(1,2)$	-0.36	0.11

PPD hat  $C_{2v}$ -Symmetrie und der allgemeine irreduzible Tensor für einen totalsymmetrischen Übergang lautet nach McClain:

$$A_1 \leftarrow A_1 = \begin{bmatrix} S_1 & 0 & 0 \\ 0 & S_2 & 0 \\ 0 & 0 & S_3 \end{bmatrix} \quad (5.11)$$

Dieser Tensor ist symmetrisch,  $M_0(1,1)$ ,  $M_2(1,2)$ ,  $M_2(1,1)$  sollten daher Null sein. Wird die Symmetrie durch Fluktuationen in der Struktur der Moleküle erniedrigt ( $C_s$ ,  $C_2$ ), sind auch nicht-symmetrische Tensoren möglich. Rechnungen mit Gaussian wurden nicht ausgeführt, die Ergebnisse für PTP legen aber nahe, dass auch bei PPD vibronische Kopplungen möglich sind. Auch hier trägt vermutlich ein einziger Übergang am meisten zum Zweiphotonentensor bei.

### *Indol*

Indol ist ein Molekül mit  $C_s$ -Symmetrie, das intensiv mit der Zweiphotonenspektroskopie untersucht wurde [8,65,79]. Die erste Absorptionsbande von Indol liegt im Bereich ab 280 nm und besteht aus zwei nahezu energetisch gleichen Singulett-Zuständen, die mit  $L_a$  und  $L_b$  bezeichnet werden und jeweils  $A'$ -Symmetrie aufweisen. Deren Anregung ist daher weder OPE noch TPE symmetrieverboten. Die einzige Symmetrieeinschränkung ist, dass das Dipolmoment innerhalb der Molekülebene (hier xy) liegen muss. Die Reihenfolge dieser Zustände ist von der Polarität des Lösemittels abhängig: Die Energie des  $L_a$ -Zustand wird am stärksten von der Polarität beeinflusst, in polaren Lösemitteln ist er der niedrigste Zustand, in unpolaren Lösemitteln kehrt sich die Reihenfolge um. Das Emissionsspektrum verändert sich drastisch, bei Cyclohexan (unpolares Lösemittel) liegt das Emissionsmaximum bei ca. 312 nm, bei Ethanol bei ca. 350 nm. Aus Messungen von teilweise ausgerichteten Indol Molekülen in Polymeren ist bekannt [60,142], dass die Übergangsdipolmomente für beide Zustände unterschiedliche Ausrichtung relativ zur langen Pseudo-Symmetrie-Achse haben, sie sind nahezu senkrecht zueinander [79]. Dies hat Auswirkungen auf die Fluoreszenzanisotropie, die bei 266 nm (Einphotonen) deutlich unter dem maximalen Wert von 0.4 liegt, was auf nicht parallele Absorptions- und Emissionsdipolmomente zurückzuführen ist. Die Absorptionsbande wird von beiden Zuständen bestimmt, die Emission erfolgt je nach Lösemittel entweder aus  $L_a$  oder  $L_b$ . Erst bei der Anregung im äußerst langwelligen Bereich der Absorptionsbande bei ca. 287 nm wird vorzugsweise der niedrigste Zustand angeregt, so dass Emissions- und Absorptionsdipolmoment parallel sind. Da bei der Anregung von  $L_a$  und  $L_b$  mit zwei Photonen verschiedene intermediäre Zustände involviert sind, weisen sie unterschiedliche Tensoren auf. Infolgedes-

sen werden sie auch durch ein unterschiedliches Größenverhältnis der M-Parameter charakterisiert.

Im Folgenden sind die Daten für Indol aufgeführt. An die Daten wurde eine biexponentielle Funktion angepasst. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zwei Rotationskorrelationszeiten für Indol gibt, diese sind jedoch aufgrund der IRF und der langen Lebensdauer nicht auflösbar.

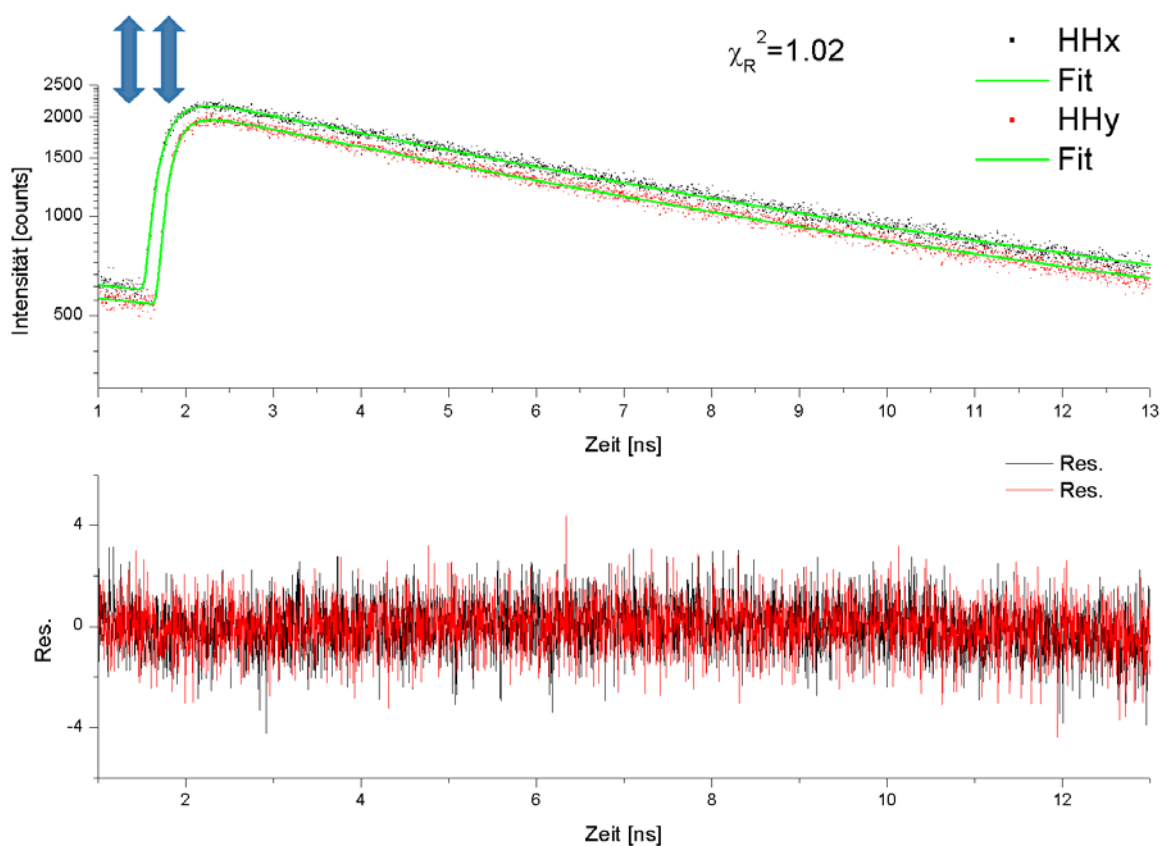


Abbildung 5-52 TCSPC-Kurven für HHx und HHy für Indol, Fit-Kurven in grün, reduzierte Residuen im unteren Teil der Abbildung.



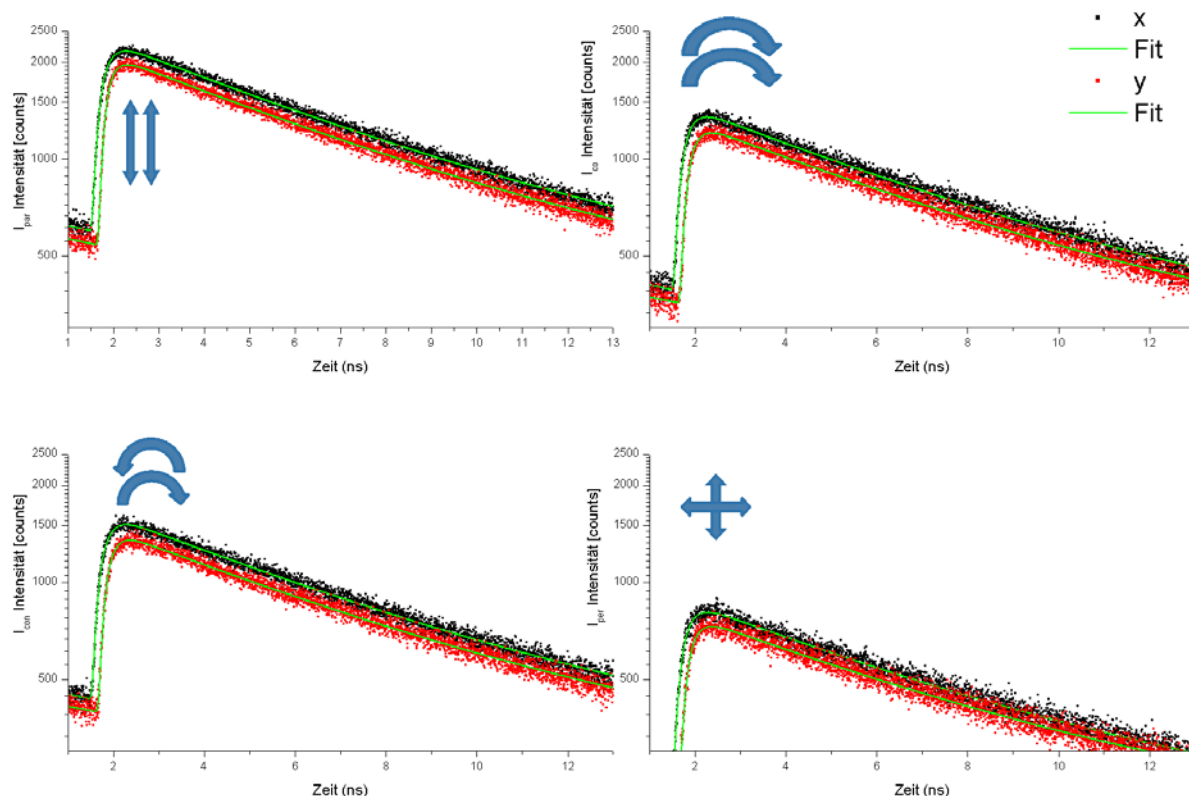


Abbildung 5-53 TSCPC-Abklingkurven für ein komplettes 2C2P-Polarisationsexperiment an Indol in Paraffin, rot 257 mW, blau 19.1 mW, Anregungspolarisationen sind in Form von Pfeilen dargestellt.

Tabelle 5-7 Daten für Indol in in Paraffin (Mineral-Öl), Standardabweichung in Klammern.

Polarisationen	HH	RR	RL	VH
Totale Intensitäten ( $t=0$ ), normiert	1 (0.01)	0.35 (0.02)	0.61 (0.01)	0.69 (0.01)
Lebensdauer $\tau_f$ (Mittelwert aller Pol.)	6760 (38) ps			
Anisotropie $r(0)$	0.10 (0.02)	- 0.05 (0.02)	- 0.03 (0.014)	0.07 (0.04)
Rotationskorrelationszeit $\tau_{rot}$ (Mittelwert aller Pol.)	160 (38) ps			

Die Fluoreszenzlebensdauer und Rotationszeit stimmen mit der Literatur überein [143]. Linear parallel polarisierte Photonen werden auch bei Indol am stärksten absorbiert, im Unterschied zu PTP/PPD sind jedoch hier die Verhältnisse für RR und RL verdreht. Der Wert für  $\Omega$  (0.61) stimmt mit Literaturergebnissen überein [8]. Die Anisotropien deutlich niedriger als für PTP und PPD. Genaue Anisotropien für Indol in Cyclohexan sind aus der Literatur nicht bekannt, bei 280 nm in Propylenglykol (-60°C) ist die TPE-Anisotropie (linear parallel polarisierte Photonen) ca. 0.2 [65]. Sie resultiert daraus, dass die Anregung in einen Zustand erfolgt, der nicht parallel zum Emissionsdipolmoment ist.

Bei den M-Parameter sind  $M_0(1,1)$ ,  $M_2(1,1)$  und  $M_2(1,2)$  relativ klein, es muss daher davon ausgegangen werden, dass der Tensor auch hier nahezu symmetrisch ist.

Tabelle 5-8 M-Parameter für Indol in Paraffin, Standardabweichung des Fits.

M-Parameter (normiert auf $M_0(2,2)$ )	Wert	Standardabweichung
$M_0(0,0)$	1.32	0.02
$M_0(1,1)$	-0.01	0.03
$M_0(2,2)$	1	0.014
$M_2(2,2)$	0.31	0.14
$M_2(0,2)$	0.44	0.11
$M_2(1,1)$	0.11	0.17
$M_2(1,2)$	-0.23	0.20

Für  $C_s$ -Symmetrie sind die irreduziblen Tensorformen der angeregten Zustände  $A'$  und  $A''$ :

$$A' \leftarrow A' = \begin{bmatrix} S_1 & S_4 & 0 \\ S_5 & S_2 & 0 \\ 0 & 0 & S_3 \end{bmatrix} \quad A'' \leftarrow A' = \begin{bmatrix} 0 & 0 & s_6 \\ 0 & 0 & s_7 \\ s_9 & s_8 & 0 \end{bmatrix} \quad (5.12)$$

Der Übergang nach  $A''$  muss laut Literatur nicht berücksichtigt werden. Callis berechnete für Übergänge in  $L_a$  und  $L_b$  Zweiphotonentensoren und führte einige Vergleiche mit experimentellen Ergebnissen durch [79]:

$$L_a \leftarrow A' = \begin{bmatrix} 0.445 & 0.000 & 0 \\ 0.127 & 0.114 & 0 \\ 0 & 0 & -0.004 \end{bmatrix} \quad L_b \leftarrow A' = \begin{bmatrix} 0.055 & 0 & 0 \\ 0.344 & -0.074 & 0 \\ 0 & 0 & -0.001 \end{bmatrix} \quad (5.13)$$

Experimentell ergibt sich für einen Übergang in den  $L_b$ -Zustand (Anregung im langwelligen Bereich) ein Wert von nahezu 1.5 für  $\Omega$ . Eine Anregung in den  $L_a$ -Zustand ergibt 0.50. Der in dieser Arbeit gemessene Wert von 0.61 für  $\Omega$  lässt darauf schließen, dass hauptsächlich in den  $L_a$ -Zustand angeregt wurde, es aber eine kleine Überlagerung mit dem  $L_b$ -Zustand gibt. Für eine Anregung in  $L_a$ , mit einem kleinen Beitrag von  $L_b$  und einen relativem Winkel des Emissionsdipolmoments zur Haupttensorachse  $x^2$  von  $47^\circ$  ergeben sich für die totalen Intensitäten und Anisotropien die Werte aus untenstehender Tabelle:

$$L_a/L_b \leftarrow A' = \begin{bmatrix} 0.4 & 0.02 & 0 \\ 0.17 & 0.05 & 0 \\ 0 & 0 & -0.0025 \end{bmatrix} \quad (5.14)$$

Tabelle 5-9 Berechnete Intensitäten und Anisotropien für einen Übergang in  $L_a/L_b$  (Tensor in 5.14) für verschiedene Polarisationskombination, Fluoreszenzdipolmoment  $45^\circ$  relativ zur Hauptensorachse.

Polarisationen	HH	RR	RL	VH
Intensitäten	1	0.61	0.70	0.31
Anisotropien	0.106	-0.035	-0.059	0.038
$\Omega (RR/HH)$	0.54			

Tabelle 5-10 Berechnete M-Parameter für Indol (Anregung in  $L_a/L_b$ ).

M-Parameter (normiert auf $M_0(2,2)$ )	Wert
$M_0(0,0)$	1.31
$M_0(1,1)$	0.014
$M_0(2,2)$	1
$M_2(2,2)$	0.208
$M_2(0,2)$	0.505
$M_2(1,1)$	-0.014
$M_2(1,2)$	0.017

Die experimentellen bestimmten M-Parameter, Anisotropien und Intensitäten liegen im Trend der berechneten Parameter. Da jedoch nicht nur  $L_a$  sondern zumindest teilweise auch  $L_b$  angeregt wird, kann eine genaue und komplette Interpretation nicht durchgeführt werden. Zusätzlich ist auch die Berechnung der Tensoren mit quantenchemischen Methoden immer fehlerbehaftet. Interessant wäre daher eine 2C2P-Anregung von Indol bei ca. 290 nm (870 nm + 435 nm), da dort jeweils nur  $L_a$  oder  $L_b$  angeregt werden. Aufgrund der Limitierung durch den Abstimmungsbereich des Ti:Saphir-Laser wurde dieses Experiment nicht durchgeführt.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurden mit den Möglichkeiten von zeit- und polarisationsaufgelöster Multiphotonenmikroskopie biologische Stoffwechselprozesse *in vivo* und physikalisch-chemische Eigenschaften von Molekülen untersucht. Hier sollen zunächst die experimentellen Methoden und Ergebnisse für den biologischen Bereich noch einmal zusammenfassend dargestellt werden.

Anhand dynamischer Stimulationsmessungen an Pankreas- $\beta$ -Zellen/Pankreasinseln konnten die Vorteile der zeitaufgelösten Multiphotonenmikroskopie gezeigt werden, d.h. es wurde ein lasermikroskopisches Verfahren für die nicht-invasive Erfassung vitaler Prozesse, wie dem Energiestoffwechsel, mit räumlicher Auflösung entwickelt und erprobt. Es wurde demonstriert, dass durch simultane Messungen von Autofluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer (FLIM) nicht nur herkömmliche mikrofluorimetrische Messungen in Pankreasinseln nachvollziehbar werden, sondern auch zusätzliche Informationen über die relative Konzentration von wichtigen Stoffwechselfaktoren wie NADH unter verschiedenen physiologischen Bedingungen erhalten werden.

Um dies zu verwirklichen, wurden zuerst die experimentellen und theoretischen Voraussetzungen geschaffen: Zum einen durch die Verbesserung eines bestehenden Zweiphotonenmikroskops, zum anderen durch die Entwicklung und Optimierung entsprechender Auswertemethoden.

In Zusammenarbeit mit der Firma LaVision Biotec konnte das bestehende Zweiphotonenmikroskop systematisch weiterentwickelt werden, um eine schnelle Aufnahmen von Fluoreszenzintensitäts- und Lebensdauerbildern möglich zu machen. Ausschlaggebend dafür war der Einbau und die Anpassung eines neuartigen Strahlenteilers in das System in Kombination mit

einem schnelleren Galvoscaner, welcher eine entscheidende Komponente für schnelle bildgebende Zweiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopie ist. Die Aufnahmegeschwindigkeit von Daten konnte dadurch um das bis zu 20fache im Vergleich zum ursprünglichen System gesteigert werden.

Ein weiterer wichtiger Schritt zur schnellen Erfassung von vitalen Prozessen war neben der Optimierung des eigentlichen Messgerätes die Entwicklung und Erprobung neuer bildgebender Methoden für die biexponentielle Auswertung von Autofluoreszenzdaten.

Für einen Ergebnisvergleich von schneller Prony-Auswertemethode und der etablierten, aber wesentlich langsameren Auswertemethode nach Levenberg-Marquardt (LM), wurde eine Software zur Berechnung von FLIM-Bildern mit dem LM-Algorithmus geschrieben. Es zeigte sich, dass die Auswertemethode nach Prony gute FLIM-Bilder für einen schnellen qualitativen Überblick über die Lebensdauerverteilungen in Farbstofflösungen und Zellen liefert. Sie eignet sich jedoch aufgrund der verrauschten Daten in Zellen und Pankreasinseln nur bedingt zur quantitativen Bestimmung der wichtigen präexponentiellen Faktoren, die bei Autofluoreszenzmessungen das Konzentrationsverhältnis von freiem und gebundenem NADH widerspiegeln. Dort liefert der LM-Algorithmus die besseren Ergebnisse.

Zur genauen Bestimmung der Vorfaktoren wurden neben den überlegenen Levenberg-Marquardt-Auswertemethoden auch sogenannte globale Fittingmethoden eingesetzt: Ändern sich die Lebensdauern wie im Falle der Stimulationsmessungen nicht signifikant, sind nur die Vorfaktoren variabel, was die Auswertung und Interpretation der Daten wesentlich vereinfacht. Nach schrittweiser Erprobung an einfachen Systemen wie immortalisierten Einzelzellen (MIN6) und frisch isolierten  $\beta$ -Zellen wurden die Methoden auf Inseln des Pankreas übertragen.

In Zusammenarbeit mit der AG Rustenbeck, TU Braunschweig wurden Pankreasinseln ausgewählten physiologischen Stimulatoren wie Glucose und KIC ausgesetzt und mit dynamischen FLIM-Messungen die NAD(P)H-Fluoreszenz untersucht. Es wurde dabei gezeigt, dass mit den eingesetzten Methoden auch dort eine gleichzeitige Messung von Fluoreszenzlebensdauern, Vorfaktoren und Intensitätsdaten möglich ist. Die erhaltenen Intensitätsdaten der Stimulierungsmessungen stimmten dabei mit den mikrofluorimetrischen Daten der AG Rustenbeck und Literaturdaten überein.

Bei Aufnahme und Auswertung der Daten wurde klar, dass unter bestimmten Bedingungen einer Reduzierung der zu betrachtenden Parameter sinnvoll sein kann. Auf eine Visualisie-

rung in 3D wurde verzichtet, stattdessen wurde ein repräsentativer 2D-Ausschnitt der eigentlich dreidimensionalen Insel des Pankreas ausgewählt.

Bei der Auswertung der FLIM-Daten von Stimulierungsmessungen mit Glucose und KIC für einzelne  $\beta$ -Zellen und Pankreasinseln wurde deutlich, dass es keine wesentliche Änderung der Lebensdauern gibt, sondern sie weitestgehend konstant um einen Mittelwert schwanken. Daher wurde zur genaueren Analyse der Vorfaktoren, die beschriebene globale Fitmethode eingesetzt. Es ergab sich, dass sich das Verhältnis von gebundenem zu freiem NAD(P)H nicht wesentlich durch Kohlenhydrat-Stimulationen ändert. Ein geringer Trend zu mehr freiem NAD(P)H bei Glucose-Gabe ist zu beobachten, die Schwankungen des Verhältnisses innerhalb der Perfusion mit nur einem Medium sind jedoch ausgeprägter.

Basierend auf der Kombination von gleichzeitiger FLIM und Intensitätsmessung, konnte daher nach Auswertung aller Daten mit den präsentierten verschiedenen Methoden und einem Abgleich mit Literaturergebnissen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die beobachtete Erhöhung der Autofluoreszenz in Pankreasinseln bei Stimulation mit Glucose oder KIC zum größten Teil durch einen allgemeinen Konzentrationsanstieg von NAD(P)H bewirkt und nur minimal durch eine Lebensdauererhöhung oder mehr gebundenes NAD(P)H verursacht wird. Es besteht die Möglichkeit, dass es kurzfristig, während des Anstiegs der Intensität durch Glucose-Stimulation (vor der Plateau-Phase, hier nicht beobachtet), zu einer erhöhten Bildung von freiem NAD(P)H kommt, was wiederum den Anteil an gebundenen NADH erniedrigen sollte. Während der Plateau-Phase liegt jedoch das gleiche Verhältnis/Gleichgewicht von gebundenem NADH zu freiem NADH vor, wie vor der Stimulation mit Glucose- oder KIC. Sowohl die Konzentration an gebundenen NAD(P)H, als auch die des freien NAD(P)H müssen dabei ansteigen.

Die in der Literatur beobachteten Änderungen von Lebensdauer und Vorfaktoren-Verhältnis treten nur bei drastischen Änderungen in der Physiologie der Zelle (Blockierung der Zellatmung oder Sauerstoffmangel) auf. Ergebnisse aus diesen Messungen können daher nicht direkt auf die physiologische Stimulation mit Glucose übertragen werden. Zusätzlich können auch die Lebensdauern und Verhältnisse der NAD(P)H-Formen je nach Zelltyp und Zellalter unterschiedlich sein.

Aufgrund dieser Variabilität sind für ein vollständiges Bild der in den jeweiligen Zelltypen ablaufenden Stoffwechselprozesse genaue Untersuchungen des Zusammenhangs von indu-

zierter Änderung des metabolischen Status, Autofluoreszenzintensität und der komplexen Bindungsverhältnisse von NAD(P)H nötig.

Im Gegensatz zu früheren Messungen, die nur auf Emissionsspektren basieren und bis 90% gebundenes NAD(P)H berichteten, zeigten die Lebensdauermessungen in Pankreaszellen, dass nicht alles NAD(P)H in gebundener Form vorliegt. Der Beitrag vom freien NADH zur Gesamtfluoreszenz ist aufgrund der Lebensdauer gering, daher neigen nicht zeitaufgelöste Messung zur Verzerrung des Konzentrationsverhältnisses und nur zeitaufgelöste Messungen, wie die in dieser Arbeit präsentierten, können das richtige Verhältnis wiedergeben.

Für die Messungen der Calciumkonzentration in Pankreasinseln und MIN6-Zellen mittels FLIM wurden neben dem Indikator Fura-2 auch andere Calciumindikatoren untersucht. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, dass zwar alle getesteten Indikatoren prinzipiell für FLIM-Messungen geeignet sind, der Calcium-Farbstoff OGB-1 jedoch die größte Dynamik hinsichtlich der Lebensdaueränderung bei Bindung an Calcium aufweist.

Durch Kalium-Depolarisationsmessungen konnte nachgewiesen werden, dass sich mit FLIM-Messungen relative Calciumkonzentrationen innerhalb einer Zelle gut abschätzen lassen, was aus Intensitätsmessungen an OGB-1 angefärbten Zellen nicht ohne weiteres möglich ist. Intensitätsmessungen sind zur Bestimmung sehr schneller Calciumkonzentrationsänderungen wie z.B. bei Nervenzellen unverzichtbar, FLIM-Daten können jedoch eine sinnvolle Ergänzung, u.a. aufgrund der Unabhängigkeit von der Fluorophor-Konzentration, bieten.

Wie oben dargestellt wurde, bietet das im Rahmen dieser Arbeit verbesserte Zweiphotonenmikroskopsystem in Kombination mit den entwickelten FLIM-Auswertemethoden ein wertvolles Werkzeug mit dem man nicht nur vergleichbare Daten wie mit herkömmlichen Methoden (Intensitätsmessungen etc.) messen kann, sondern simultan weitere Daten über weitere Einflussgrößen durch Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer erhält.

### *Polarisationsmessungen*

Weiterhin konnte erstmals anhand von durch zwei Photonen induzierter Fluoreszenzmessungen mit polarisiertem Licht, die in der Theorie mehrfach postulierten sogenannten „Kompletten Polarisationsexperimente“ praktisch demonstriert werden. Durch diese Art von Experimenten ist es möglich, den Prozess der simultanen Absorption zweier Photonen näher zu charakterisieren: Das heißt unter anderem die Rolle der involvierten intermediären Zustände nä-



her zu beleuchten und die Symmetrien der elektronisch angeregten Zustände und die relative Ausrichtung der Emissionsdipolmomente von Molekülen zu bestimmen.

Zunächst wurde auf Basis der theoretischen Beschreibungen von McClain, Callis, Vasyutinskii und anderen die für die Polarisationsexperimente wichtigen Grundlagen detailliert dargestellt. Kurz gefasst gilt: Das Pendant zum bekannten Übergangsdipolmoment bei OPE ist bei TPE ein sogenannter Tensor (3x3-Matrix). Die Intensität der simultanen Absorption zweier Photonen verschiedener Polarisierung wird prinzipiell durch die Größe dieses Tensors bestimmt. Die Intensität einer anschließenden Emission eines polarisierten Fluoreszenzphotons wird erneut durch die Größe dieses Tensors und zusätzlich durch das Emissionsdipolmoment bestimmt. Verläuft die Anregung über virtuelle Zwischenzustände (d.h. keine Resonanz der Photonen mit realen Zuständen) und findet keine Rotation der Moleküle zwischen Anregung und Emission statt, wird nun die Beziehung zwischen den Elementen dieses Tensors, des Dipolmoments und einer gemessenen Fluoreszenzintensität durch maximal sieben molekulare Parameter (M-Parameter) beschrieben: Es gibt drei isotrope und vier anisotrope Parameter.

Bei der Erläuterung der Theorie wurde darauf Wert gelegt, einen Bezug zwischen den eher abstrakten theoretischen molekularen Parametern und den aus der Literatur bekannteren Größen wie der Anisotropie, dem  $\Omega$ -Parameter und den totalen Fluoreszenzintensitäten herzustellen. Anhand mehrerer vereinfachter Beispielrechnungen und Grafiken wurde erklärt, welche Größen die molekularen Parameter annehmen können und wie die Tensoren bzw. Dipolmomente und die korrespondierenden Anisotropien etc. beschaffen sind.

Im experimentellen Teil wurde anschließend dargelegt mit welchem Messaufbau sich die molekularen Parameter bestimmen lassen. Für die kompletten Experimente ist ein Aufbau nötig, bei dem sich die Polarisierungen der zwei Anregungsphotonen und der Emissionsphotonen unabhängig voneinander einstellen lassen. Zusätzlich müssen die Wellenlängen der Anregungsphotonen sehr unterschiedlich sein und die Anregungsquellen Stabilität hinsichtlich ihrer Leistung aufweisen und kurzgepulst (mindestens Pikosekunden) sein. Gemäß der Theorie darf zwischen Absorption und Emission keine Rotation der Moleküle stattfinden, d.h. entweder müssen sich die Moleküle in einer gefrorenen Lösung bei unter 70 K befinden oder die Detektion der Emission muss entsprechend hoch zeitaufgelöst sein, damit die molekularen Parameter präzise zum Zeitpunkt der Anregung (=keine Rotation) bestimmbar sind.

Alle sieben M-Parameter zu messen ist nur unter diesen Voraussetzungen möglich. Nur vier dieser Parameter (zwei isotrope, zwei anisotrope) lassen sich dagegen mit herkömmlicher Zweiphotonenspektroskopie (gleiche Polarisationen und Wellenlänge) messen.

Grundlage waren daher die Experimente von Quentmeier und Denicke zur Zweifarben-Zweiphotonenanregung (2C2P) mit Femtosekundenpulsen. Hier werden bei räumlicher und zeitlicher Synchronisation ein 400 nm Photon und ein 800 nm Photon simultan absorbiert, was einer Einphotonenanregung bei 266 nm entspricht. Der dazu vorhandene Aufbau wurde im Rahmen der Arbeit für die Polarisationsexperimente erweitert und optimiert.

Durch Kombination von linear (senkrecht und parallel) und zirkular (gleichsinnig und gegen-sinnig) polarisierten Anregungsphotonen und der Messung der Fluoreszenzanisotropie konnten sieben unabhängige Experimente realisiert werden, die zur Bestimmung der molekularen Parameter mindestens nötig sind.

Für die Detektion der Fluoreszenz kam ein hoch zeitaufgelöstes TCSPC-System mit zwei Avalanche-Photodioden und einem Polarisationsprisma zum Einsatz, was eine gleichzeitige Aufnahme der Daten für beide Richtungen der Polarisation der Fluoreszenz ermöglichte. Ein einfacher Leitfaden wurde aufgestellt, wie die molekularen Parameter aus sieben Experimenten zu ermitteln sind.

Exemplarisch wurden diese Zweifarben-Zweiphotonen-Anisotropiemessungen an den Fluorophoren *para*-Terphenyl (PTP), 2,5-Diphenyl-1,3,4-oxadiazol (PPD) und Indol in Lösung durchgeführt und so erstmals experimentelle Daten für komplette Polarisationsexperimente gezeigt.

An die experimentellen Daten wurde unter Verwendung einer globalen Fitmethode wie bei NAD(P)H eine biexponentielle Funktion angepasst. Nach der Anregung mit kurzen Pulsen fluoreszieren die Moleküle und gleichzeitig findet Rotationsdiffusion statt, was sich in der Signalform der Daten widerspiegelt. Globale Parameter waren daher hier die Fluoreszenzlebensdauer und die Rotationskorrelationszeit der Moleküle, variabel waren dagegen die Vorfaktoren der Funktion. Ziel war die Ermittlung der Fluoreszenzintensität direkt nach der Anregung ( $t=0$ ), d.h. zu einem Zeitpunkt wo noch keine Rotation der Moleküle stattgefunden hat. Hierbei musste im Gegensatz zu den NAD(P)H-Daten auch die Antwortfunktion (IRF) der Detektoren beim Fitprozess berücksichtigt werden. Da die Detektoren eine Wellenlängenabhängigkeit aufweisen, war die genaue Messung der IRF von entscheidender Bedeutung. Unter Nutzung des nichtlinearen Effekts der Weißlichterzeugung durch kurze intensive Pulse

konnte die IRF präzise ermittelt werden. Zur Auswertung wurde ein Matlab-Programm der AG Gericke benutzt, dass die Verarbeitung der Daten unter Einbeziehung der Antwortfunktion („Vorwärts-Faltung“) erlaubte.

Nach dieser genauen Analyse der Daten konnten die M-Parameter für alle Fluorophore berechnet und daraus Rückschlüsse auf die Tensoren und die Dipolmomente geschlossen werden:

Aus Daten für PTP ergab sich, dass vier große Parameter und drei deutlich kleine Parameter (nahe Null) die Fluoreszenzanisotropiedaten am besten beschreiben. Das bedeutet, dass der Zweiphotonen-Tensor durch ein einziges Element dominiert wird und dass das Emissionsdipolmoment nahezu parallel dazu ist; der angeregte Zustand ist totalsymmetrisch. Ein Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit quantenchemischen Rechnungen führte zu der Schlussfolgerung, dass eine Anregung in einen eigentlich aus Symmetriegründen verbotenen Zustand stattfindet, diese jedoch durch Kopplung mit Schwingungsmoden erlaubt wird („Vibronische Kopplungen“). Die Absorption und Emission ist demzufolge bei PTP hauptsächlich entlang der langen Molekülachse polarisiert. Ein Vergleich mit teilweise vorhandenen Literaturdaten ergab ein ähnliches Bild.

Für das PPD-Molekül weist der Tensor ähnlich geringe Komplexität wie bei PTP auf. Die Verhältnisse der molekularen Parameter sind ähnlich, auch hier gibt es ein dominierendes Tensorelement und ein dazu paralleles Emissionsdipolmoment.

Bei Indol hingegen sind die Verhältnisse deutlich komplizierter, da es bei der Anregung zu einer Überlagerung von zwei nahezu energetisch gleichen Zuständen kommt. Diese Zustände weisen theoretisch jeweils unterschiedliche Tensoren auf. Bei den molekularen Parametern ergaben sich daher deutlich andere Verhältnisse als bei PTP oder PPD. Jedoch sind auch hier vier Parameter deutlich größer als die anderen. Ein Vergleich mit theoretisch berechneten Literaturdaten ergab eine relativ gute Übereinstimmung, aber aufgrund der Überlagerung der Zustände waren keine vollständigen Aussagen möglich. Abhilfe kann hier nur eine Anregung bei weiteren Wellenlängen schaffen.

Eine Optimierung der Anregungspolarisationen ist sicherlich durchführbar, um die Genauigkeit der Parameter zu erhöhen. Minimale Dejustierungen manifestierten sich in kleinen systematischen Abweichungen von der Theorie.

Weiterer Erforschung bedarf der Effekt der Erniedrigung der Anisotropie bei zeitaufgelösten Messungen. Dies könnte z.B. durch schrittweises Herunterkühlen der Proben geschehen und dem Messen der Anfangsanisotropien ( $t=0$ ) bei verschiedenen Temperaturen.

Gerade bei den Anfangsanisotropien existieren allerdings auch einige Diskrepanzen in der Literatur. Bei Anfangsanisotropien, die in der Frequenzdomäne gemessen wurden, konnten keine starken Abweichungen zu den erwarteten Werten festgestellt werden, bei Messungen in der Zeitdomäne dagegen schon. Ein Grund für die Diskrepanz ist möglicherweise der Schwerpunkt vieler Veröffentlichungen auf die Ermittlung der Rotationskorrelationszeiten. Auf Abweichungen der Anfangsanisotropie wurde daher vielfach nicht näher eingegangen und nur generelle Tendenzen waren entscheidend, wie z.B. der Vergleich zwischen Dreiphotonenanisotropien und Einphotonenanisotropien von PTP in Propandiol [64].

Die angeregten Zustände der untersuchten Moleküle zeigen alle Totalsymmetrie ( $A_g$ ,  $A'$ ) und die Übergänge weisen relativ einfache Tensoren auf, was sich in den gemessenen Parametern widerspiegelt. Von Interesse ist es daher den Wellenlängenbereich des 2C2P-Systems zu erweitern, um auch andere elektronische Zustände (nicht totalsymmetrisch,  $B_g$ ,  $E_{1g}$ ) bzw. Moleküle zu charakterisieren, die deutlich andere Werte der molekulare Parameter aufweisen könnten. Das verwendete System war durch den Ti:Saphir Laser auf den sehr engen Bereich von 260 nm–273 nm limitiert. Andere Moleküle von Interesse könnten z.B. neben Indol, auch Benzol und Triphenylen sein.

Anhand dieser grundlegenden ersten Daten und dem Vergleich mit der Literatur und Berechnungen kann geschlussfolgert werden, dass die theoretischen Voraussagen hinsichtlich der Tensoren, Dipolmomente und Parameter erstmals experimentell belegt worden sind und dass der 2C2P-Aufbau und die entwickelten Auswertemethoden viele potentielle Möglichkeiten für weitere vollständige Charakterisierungen von elektronischen Zuständen und Übergängen in Molekülen bieten.

## 7 LITERATUR

- [1] Callis P R 1997 Two-photon-induced fluorescence *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48** 271–97.
- [2] Denk W, Strickler J H und Webb W W 1990 Two-photon Laser Scanning Microscopy *Science* **248** 73–6.
- [3] McClain W M 1974 Two-photon molecular spectroscopy *Acc. Chem. Res.* **7** 129–35.
- [4] McClain W M 1973 Polarization of two-photon excited fluorescence *J. Chem. Phys.* **58** 314–23.
- [5] Drucker R P und McClain W M 1974 Polarized two-photon studies of biphenyl and several derivatives *J. Chem. Phys.* **61** 2609–15.
- [6] Dick B und Hohlneicher G 1985 Two-photon spectroscopy of the biphenyl chromophore. The electronic excited states of biphenyl and fluorene below 50000 cm<sup>-1</sup> *Chem. Phys.* **94** 131–45.
- [7] Scott T W, Haber K S und Albrecht A C 1983 Two-photon photoselection in rigid solutions: A study of the B<sub>2u</sub> ← Ag transition in benzene *J. Chem. Phys.* **78** 150–7.
- [8] Anderson B E, Jones R D, Rehms A A, Ilich P und Callis P R 1986 Polarized two-photon fluorescence excitation spectra of indole and benzimidazole *Chem. Phys. Lett.* **125** 106–12.
- [9] Lakowicz J R, Gryczynski I, Malak H und Gryczynski Z 1996 Two-color two-photon excitation of fluorescence *Photochemistry and Photobiology* **64** 632–5.
- [10] Quentmeier S, Denicke S, Ehlers J-E, Niesner R A und Gericke K-H 2008 Two-color two-photon excitation using femtosecond laser pulses *J. Phys. Chem. B* **112** 5768–73.
- [11] Statistisches Bundesamt 2008 Pressemitteilung Nr. 425 vom 13.11.2008.
- [12] Holl R W, Wabitsch M und Heinze E 2001 Type-2-diabetes in children and adolescents *Monatsschrift für Kinderheilkunde* **149** 660–9.
- [13] Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K und Forth W 2008 *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (München: Elsevier Urban & Fischer).
- [14] Henquin J-C 2000 Triggering and Amplifying Pathways of Regulation of Insulin Secretion by Glucose *Diabetes* **49** 1751–60.
- [15] Lakowicz J R, Szmajcinski H, Nowaczyk K und Johnson M L 1992 Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** 1271–5.
- [16] Vishwasrao H D, Heikal A A, Kasischke K A und Webb W W 2005 Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy *J. Biol. Chem.* **280** 25119–26.
- [17] Niesner R A 2005 *New advancements in highly sensitive time-resolved fluorescence two-photon microscopy. Theoretical approaches and bioscientific applications*. Dissertation (Braunschweig).
- [18] Berridge M J, Bootman M D und Lipp P 1998 Calcium - a life and death signal *Nature* **395** 645–8.
- [19] Takahashi A, Camacho P, Lechleiter J D und Herman B 1999 Measurement of Intracellular Calcium *Physiol. Rev.* **79** 1089–125.
- [20] Lakowicz J R, Szmajcinski H und Johnson M L 1992 Calcium imaging using fluorescence lifetimes and long-wavelength probes *J. Fluoresc.* **2** 47–62.
- [21] Hecht E 2005 *Optik* (München: Oldenbourg).
- [22] Zinth W und Zinth U 2009 *Optik. Lichtstrahlen, Wellen, Photonen* (München: Oldenbourg).
- [23] Kasper A 1997 *Erzeugung und Charakterisierung ultrakurzer Lichtpulse aus Titan:Saphir Laser-Oszillatoren*. Dissertation (München).

- [24] Nijegorodov N I und Downey W S 1994 The Influence of Planarity and Rigidity on the Absorption and Fluorescence Parameters and Intersystem Crossing Rate Constant in Aromatic Molecules *J. Phys. Chem.* **98** 5639–43.
- [25] Gerritsen H C, Sanders R, Draaijer A, Ince C und Levine Y K 1997 Fluorescence lifetime imaging of oxygen in living cells *J. Fluoresc.* **7** 11–5.
- [26] Hanson K M, Behne M J, Barry N P, Mauro T M, Gratton E und Clegg R M 2002 Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient *Biophys. J.* **83** 1682–90.
- [27] Szmecinski H und Lakowicz J R 1995 Possibility of simultaneously measuring low and high calcium concentrations using Fura-2 and lifetime-based sensing *Cell Calcium* **18** 64–75.
- [28] Benninger R, Hofmann O, McGinty J, Requejo-Isidro J, Munro I, Neil M, Demello A und French P 2005 Time-resolved fluorescence imaging of solvent interactions in microfluidic devices *Opt. Express* **13** 6275–85.
- [29] Friedrich D M und McClain W M 1975 Polarization and assignment of the two-photon excitation spectrum of benzene vapor *Chem. Phys. Lett.* **32** 541–9.
- [30] Göppert-Mayer M 1931 Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen *Ann. Phys.* **9** 273–94.
- [31] Xu C, Zipfel W, Shear J B, Williams R M und Webb W W 1996 Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 10763–8.
- [32] Makarov N S, Drobizhev M und Rebane A 2008 Two-photon absorption standards in the 550–1600 nm excitation wavelength range *Opt. Express* **16** 4029–47.
- [33] Scott G T, Spencer R D, Leonard N J und Weber G 1970 Studies of fluorescence lifetimes and quantum efficiencies of NADH, AcPyADH, and simplified synthetic models *J. Am. Chem. Soc.* **92** 687–95.
- [34] Zipfel W R, Williams R M und Webb W W 2003 Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences *Nature Biotechnology* **21** 1369–77.
- [35] Joseph R. Lakowicz 2002 *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 5: Nonlinear and Two-Photon Induced Fluorescence* (New York, Boston, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers Group).
- [36] Helmchen F und Denk W 2005 Deep tissue two-photon microscopy *Nature Methods* **2** 932–40.
- [37] Göbel W und Helmchen F 2007 In vivo calcium imaging of neural network function *Physiology* **22** 358–65.
- [38] Zipfel W R, Williams R M, Christie R, Nikitin A Y, Hyman B T und Webb W W 2003 Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 7075–80.
- [39] König K und Riemann I 2003 High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution *J. Biomed. Opt.* **8** 432–9.
- [40] Fröhlich D und Mahr H 1966 Two-Photon Spectroscopy in Anthracene *Phys. Rev. Lett.* **16** 895.
- [41] Monson P R und McClain W M 1972 Complete Polarization Study of the Two-Photon Absorption of Liquid 1-Chloronaphthalene *J. Chem. Phys.* **56** 4817–25.
- [42] Monson P R und McClain W M 1970 Polarization dependence of the two-photon absorption of tumbling molecules with application to liquid 1-chloronaphthalene and benzene *J. Chem. Phys.* **53** 29–37.
- [43] McClain W M 1971 Excited state symmetry assignment through polarized two-photon absorption studies of fluids *J. Chem. Phys.* **55** 2789–96.

- [44] Mikami N und Hong H-K 1979 Polarized Two-Photon Absorption Spectra of Naphtalene in Durene Single Crystals with Two Synchronized Tunable Dye Lasers *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **52** 3484–95.
- [45] Hampf W, Neusser H J und Schlag E W 1977 Molecular two-photon spectroscopy with two synchronized tunable dye lasers *Chem. Phys. Lett.* **46** 406–10.
- [46] Alonzo C A, Saloma C und Wilson G 2005 Generation of optical-beam induced current via two-color (two-photon) excitation *Opt. Commun.* **246** 117–22.
- [47] Blanca C M und Saloma C 2001 Two-color excitation fluorescence microscopy through highly scattering media *App. Opt.* **40** 2722–9.
- [48] Cambaliza M O und Saloma C 2000 Advantages of two-color excitation fluorescence microscopy with two confocal excitation beams *Opt. Commun.* **184** 25–35.
- [49] Lim M und Saloma C 2003 Primary spherical aberration in two-color two-photon excitation fluorescence microscopy with two confocal excitation beams *App. Opt.* **42** 3398–406.
- [50] Chen J und Midorikawa K 2004 Two-color two-photon 4Pi fluorescence microscopy *OPTICS LETTERS* **29** 1354–6.
- [51] Wang C, Qiao L, Mao Z, Cheng Y und Xu Z 2008 Reduced deep-tissue image degradation in three-dimensional multiphoton microscopy with concentric two-color two-photon fluorescence excitation *J. Opt. Soc. Am. B.: Phys.* **25** 976–82.
- [52] Ni J, Qiao L, Wang C, Zhao F, Cheng Y und Xu Z 2009 Two-colour two-photon confocal microscopy with isotropic three-dimensional resolution and parallel excitation *J. Microsc.* **234** 205–10.
- [53] Qiao L, Ni J, Mao Z, Wang C und Cheng Y 2009 Two-color two-photon excitation of indole using a femtosecond laser regenerative amplifier *Opt. Commun.* **282** 1056–61.
- [54] Lakowicz J R, Gryczynski I, Malak H und Gryczynski Z 1996 Fluorescence spectral properties of 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole with two-color two-photon excitation *J. Phys. Chem.* **100** 19406–11.
- [55] Gryczynski I, Malak H und Lakowicz J R 1997 Two-color two-photon excitation of indole *Biospectroscopy* **3** 97–101.
- [56] Quentmeier S, Denicke S und Gericke K-H 2009 Two-Color Two-Photon Fluorescence Laser Scanning Microscopy *J. Fluoresc.* **19** 1037–43.
- [57] Denicke S, Quentmeier S, Ehlers J-E und Gericke K-H 2009 Applications of the time-resolved two-colour two-photon excitation of UV fluorophores using femtosecond laser pulses *Phys. Scr.* **80** 048105–048105.
- [58] Quentmeier S, Quentmeier C, Walla P J und Gericke K-H 2009 Two-Color Two photon excitation of intrinsic protein fluorescence: a label free observation of a proteolytic digestion of BSA *Chemphyschem* **10** 1607–13.
- [59] Wanapun D, Wampler R D, Begue N J und Simpson G J 2008 Polarization-dependent two-photon absorption for the determination of protein secondary structure: A theoretical study *Chem. Phys. Lett.* **455** 6–12.
- [60] Lakowicz J R 2006 *Principles of fluorescence spectroscopy* (New York, NY: Springer).
- [61] Bahlmann K und Hell S W 2000 Depolarization by high aperture focusing *Appl Phys Lett* **77** 612–4.
- [62] Förster T 1959 10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation *Discussions of the Faraday Society* **27** 7–17.
- [63] Weber G 1954 Dependence of the polarization of the fluorescence on the concentration *Transactions. Farad. Soc.* **50** 552–5.
- [64] Volkmer A, Hatrick D A und Birch D J S 1997 Time-resolved nonlinear fluorescence spectroscopy using femtosecond multiphoton excitation and single-photon timing detection *Meas Sci Technol* **8** 1339–49.

- [65] Lakowicz J R, Gryczynski I, Danielsen E und Frisoli J 1992 Anisotropy spectra of indole and N-acetyl-L-tryptophanamide observed for two-photon excitation of fluorescence *Chem. Phys. Lett.* **194** 282–7.
- [66] Lakowicz J R und Gryczynski I 1992 Tryptophan fluorescence intensity and anisotropy decays of human serum albumin resulting from one-photon and two-photon excitation *Biophys. Chem.* **45** 1–6.
- [67] Favro L D 1960 Theory of the rotational Brownian motion of a free rigid body *Physical Review* **119** 53–62.
- [68] Tao T 1969 Time-dependent fluorescence depolarization and Brownian rotational diffusion coefficients of macromolecules *Biopolymers* **8** 609–32.
- [69] Barkley M D, Kowalczyk A A und Brand L 1981 Fluorescence decay studies of anisotropic rotations of small molecules *J. Chem. Phys.* **75** 3581–93.
- [70] Myers A B und Hochstrasser R M 1986 Time resolved fluorescence depolarization and four wave-mixing from an ensemble of free symmetric rotors *J. Chem. Phys.* **85** 6301–14.
- [71] Myers A B, Pereira M A, Holt P L und Hochstrasser R M 1987 Rotational dynamics of electronically excited aniline in solution from picosecond fluorescence anisotropies *J. Chem. Phys.* **86** 5146–55.
- [72] Wirth M J, Koskela A und Sanders M J 1981 Molecular Symmetry and Two-Photon Spectroscopy *Appl. Spectrosc.* **35** 14–21.
- [73] Nascimento M A C 1983 The polarization dependence of two-photon absorption rates for randomly oriented molecules *Chem. Phys.* **74** 51–66.
- [74] Wan C und Johnson C K 1994 Time-resolved anisotropic two-photon spectroscopy *Chem. Phys.* **179** 513–31.
- [75] Wan C und Johnson C K 1994 Time-resolved two-photon induced anisotropy decay: The rotational diffusion regime *J. Chem. Phys.* **101** 10283–91.
- [76] Ryderfors L, Mukhtar E und Johansson L B-A 2007 Two-photon excited fluorescence and molecular reorientations in liquid solutions *J. Fluoresc.* **17** 466–80.
- [77] Andrews D L und Webb B S 1990 Two-photon photoselection: An irreducible tensor analysis *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **86** 3051–65.
- [78] Shternin P S, Gericke K-H und Vasyutinskii O S 2009 The polarization of two-photon excited fluorescence in rotating molecules *Molecular Physics* **xx** xx-xx.
- [79] Callis P R 1993 On the theory of two-photon induced fluorescence anisotropy with application to indoles *J. Chem. Phys.* **99** 27–37.
- [80] McClain W M 1972 Polarization dependence of three-photon phenomena for randomly oriented molecules *J. Chem. Phys.* **57** 2264–72.
- [81] Chen S-Y und van der Meer B W 1993 Theory of two-photon induced fluorescence anisotropy decay in membranes *Biophys. J.* **64** 1567–75.
- [82] Ying W 2008 NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences *Antioxid. Redox Signal.* **10** 179–206.
- [83] Mayevsky A und Chance B 2007 Oxidation-reduction states of NADH in vivo: from animals to clinical use *Mitochondrion* **7** 330–9.
- [84] Pollak N, Dölle C und Ziegler M 2007 The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions *Biochem. J.* **402** 205–18.
- [85] Yu Q und Heikal A A 2009 Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **95** 46–57.
- [86] Evans N D, Gnudi L, Rolinski O J, Birch D J S und Pickup J C 2005 Glucose-dependent changes in NAD(P)H-related fluorescence lifetime of adipocytes and fibroblasts in vitro: potential for non-invasive glucose sensing in diabetes mellitus *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **80** 122–9.



- [87] Rocheleau J V, Head W S und Piston D W 2004 Quantitative NAD(P)H/flavoprotein autofluorescence imaging reveals metabolic mechanisms of pancreatic islet pyruvate response *J. Biochem. Chem.* **279** 31780–7.
- [88] Panten U, Christians J und van Kriegstein E 1973 Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perfused isolated pancreatic islets *Diabetologia* **9** 477–82.
- [89] Luciani D S, Misler S und Polonsky K S 2006  $\text{Ca}^{2+}$  controls slow NAD(P)H oscillations in glucose-stimulated mouse pancreatic islets *J. Physiol.* **572** 379–92.
- [90] Bennett B D, Jetton T L, Ying G, Magnuson M A und Piston D W 1996 Quantitative subcellular imaging of glucose metabolism within intact pancreatic islets *J. Biochem. Chem.* **271** 3647–51.
- [91] Piston D W, Masters B R und Webb W W 1995 Three-dimensionally resolved NAD(P)H cellular metabolic redox imaging of the in situ cornea with two-photon excitation laser scanning microscopy *J. Microsc.* **178** 20–7.
- [92] Couprie M E, Merola F, Tauc P, Garzella D, Delboulbe A, Hara T und Billardon M 1994 First use of the UV Super-ACO free-electron laser: Fluorescence decays and rotational dynamics of the NADH coenzyme *Rev. Sci. Instrum.* **65** 1485–95.
- [93] König K, Berns M W und Tromberg B J 1995 Time-resolved and steady-state fluorescence measurements of beta-nicotinamide adenine dinucleotide-alcohol dehydrogenase complex during UVA exposure *J. Photochem. Photobio. B: Bio* **37** 91–5.
- [94] Carafoli E, Santella L, Branca D und Brini M 2001 Generation, Control, and Processing of Cellular Calcium Signals *Crit. Rev. Biochem. Mol. Bio.* **36** 107–260.
- [95] Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Oka Y, Yamamura Y und Shibasaki Y 1990 Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms *Endocrinology* **127** 126–32.
- [96] Wienbergen A 2006 *Die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Pankreasinseln als Vermittler der insulinotropen Wirkung von Glucose-selektiven und nicht-Glucose-selektiven Stimuli*. Dissertation (Braunschweig: Univ.-Bibl.).
- [97] Becker W 2006 *The bh TCSPC Handbook*.
- [98] Fricke M und Nielsen T 2005 Two-dimensional imaging without scanning by multifocal multiphoton microscopy *App. Opt.* **44** 2984–8.
- [99] Nielsen T, Fricke M, Hellweg D und Andresen P 2000 High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy *J. Microsc.* **201** 368–376.
- [100] König K, So P T C, Mantulin W W, Tromberg B J und Gratton E 1996 Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress *J. Microsc.* **183** 197–204.
- [101] Peker B 2006 *Zeitaufgelöste Zweiphotonenlasermikroskopie zur In-vivo-Charakterisierung von Zellparametern und endogener NAD(P)H-Fluoreszenz*. Dissertation (Braunschweig: [s.n.]).
- [102] Quentmeier S 2008 *Two-color two-photon microscopy*. Dissertation (Braunschweig).
- [103] Niesner R A, Peker B, Schlüsche P und Gericke K-H 2004 Noniterative biexponential fluorescence lifetime imaging in the investigation of cellular metabolism by means of NAD(P)H autofluorescence *Chemphyschem* **5** 1141–9.
- [104] Levenberg K 1944 A Method for the Solution of Certain Problems in Least Squares *Quart. Appl. Math.* **2** 164–8.
- [105] Marquardt D 1963 An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters *SIAM J. Appl. Math.* **11** 431–41.
- [106] Denicke S, Ehlers J-E, Niesner R A, Quentmeier S und Gericke K-H 2007 Steady-state and time-resolved two-photon fluorescence microscopy: A versatile tool for probing cellular environment and function *Phys. Scr.* **76**.

- [107] Verveer P J, Squire A und Bastiaens P I H 2000 Global analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy data *Biophys. J.* **78** 2127–37.
- [108] Pelet S, Previte M J, Laiho L H und So P T 2004 A fast global fitting algorithm for fluorescence lifetime imaging microscopy based on image segmentation *Biophys. J.* **87** 2807–17.
- [109] Habenicht A, Hjelm J, Mukhtar E, Bergström F und Johansson L B Å 2002 Two-photon excitation and time-resolved fluorescence: I. The proper response function for analysing single-photon counting experiments *Chem. Phys. Lett.* **354** 367–75.
- [110] Zheltikov A M 2006 Let there be white light: Supercontinuum generation by ultrashort laser pulses *Physics-Uspekhi* **49** 605–28.
- [111] Ryderfors L 2008 *Two-Photon Excited Fluorescence Depolarisation. Experimental and Theoretical Development* (Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis).
- [112] Suhling K, French P M W und Phillips D 2005 Time-resolved fluorescence microscopy *Photochemical and Photobiological Sciences* **4** 13–22.
- [113] Crutzen M, Ameloot M, Boens N, Negri R M und Schryver F C de 1993 Global analysis of unmatched polarized fluorescence decay curves *J. Phys. Chem.* **97** 8133–45.
- [114] Kapusta P, Erdmann R, Ortmann U und Wahl M 2003 Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Measurements Made Simple *J. Fluoresc.* **13** 179–83.
- [115] Cross A J und Fleming G R 1984 Analysis of time-resolved fluorescence anisotropy decays *Biophys. J.* **46** 45–56.
- [116] Papenhuijzen J und Visser A J 1983 Simulation of convoluted and exact emission anisotropy decay profiles *Biophys. Chem.* **17** 57–65.
- [117] Ramanujan V K, Jo J A, Cantu G und Herman B A 2008 Spatially resolved fluorescence lifetime mapping of enzyme kinetics in living cells *J. Microsc.* **230** 329–38.
- [118] Kumar S *et al.* 2007 Multifocal multiphoton excitation and time correlated single photon counting detection for 3-D fluorescence lifetime imaging *Opt. Express* **15** 12548–61.
- [119] Panten U 1975 Effects of alpha ketomonocarboxylic acids upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets *NAUNYN.SCHMIED.ARCH.PHARM.* **291** 405–20.
- [120] Urban K 2005 *Untersuchungen zum Mechanismus der Nährstoffinduzierten Insulinsekretion*. Dissertation (Braunschweig).
- [121] Bird D K, Yan L, Vrotsos K M, Eliceiri K W, Vaughan E M, Keely P J, White J G und Ramanujam N 2005 Metabolic mapping of MCF10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH *Cancer Res.* **65** 8766–73.
- [122] Skala M C, Riching K M, Bird D K, Gendron-Fitzpatrick A, Eickhoff J, Eliceiri K W, Keely P J und Ramanujam N 2007 In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia *J. Biomed. Opt.* **12** 24014.
- [123] Wakita M, Nishimura G und Tamura M 1995 Some characteristics of the fluorescence lifetime of reduced pyridine nucleotides in isolated mitochondria, isolated hepatocytes, and perfused rat liver in situ *J. Biochem.* **118** 1151–60.
- [124] Grynkiewicz G, Tsien R und Poenie M 1985 A New Generation of  $\text{Ca}^{2+}$  Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties *J. Biochem. Chem.* **260** 3440–50.
- [125] Tsien R Y 1980 New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures *Biochemistry* **19** 2396–404.
- [126] Anonymus 2005 *The Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Web Edition*.
- [127] Denicke S 2006 *Neue Detektionsmethode zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbestimmung durch bildgebende Fluoreszenzlebensdauermessungen*. Diplomarbeit (Braunschweig).

- [128] Tsien R Y und Pozzan T 1989 Measurement of Cytosolic Free Calcium with Quin-2 *Meth. Enzym.* **172** 230–62.
- [129] Wilms C D und Eilers J 2007 Photo-physical properties of Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes suitable for two-photon fluorescence-lifetime recordings *J. Microsc.* **225** 209–13.
- [130] Wilms C D, Schmidt H und Eilers J 2006 Quantitative two-photon Ca<sup>2+</sup> imaging via fluorescence lifetime analysis *Cell Calcium* **40** 73–9.
- [131] Thomas D, Tovey S C, Collins T J, Bootman M D, Berridge M J und Lipp P 2000 A comparison of fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca<sup>2+</sup> signals *Cell Calcium* **28** 213–23.
- [132] Agronskaia A V, Gerritsen H C und Tertoolen L 2004 Fast fluorescence lifetime imaging of calcium in living cells *J. Biomed. Opt.* **9** 1230–337.
- [133] Axelrod D 1979 Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization *Biophys. J.* **26** 557–73.
- [134] Fisz J J 2007 Fluorescence polarization spectroscopy at combined high-aperture excitation and detection: application to one-photon-excitation fluorescence microscopy *J. Phys. Chem. A* **111** 8606–21.
- [135] Fisz J J 2007 Another look at magic-angle-detected fluorescence and emission anisotropy decays in fluorescence microscopy *J. Phys. Chem. A* **111** 12867–70.
- [136] Ito N, Kajimoto O und Hara K 2000 Picosecond time-resolved fluorescence depolarization of p-terphenyl at high pressures *Chem. Phys. Lett.* **318** 118–24.
- [137] Boens N *et al.* 2007 Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy *Anal. Chem.* **79** 2137–49.
- [138] Honda K und Furukawa Y 2005 Conformational analysis of p-terphenyl by vibrational spectroscopy and density functional theory calculations *J. Mol. Struct.* **735-736** 11–9.
- [139] Zhuravlev K K und McCluskey M D 2004 Conformation of p-terphenyl under hydrostatic pressure *J. Chem. Phys.* **120** 1841–5.
- [140] Benzler J und Luther K 1997 Rotational relaxation of biphenyl and p-terphenyl in n-alkanes: the breakdown of the hydrodynamic description *Chem. Phys. Lett.* **279** 333–8.
- [141] Ryderfors L, Mukhtar E und Johansson L B Å 2007 The symmetry of two-photon excited states as determined by time-resolved fluorescence depolarization experiments *J. Phys. Chem. A* **111** 11531–9.
- [142] Albinsson B und Nórden B 1992 Excited-State Properties of the Indole Chromophore. Electronic Transition Moment Directions from Linear Dichroism Measurements: Effect of Methyl and Methoxy Substituents *J. Phys. Chem.* **96** 6204–12.
- [143] Lakowicz J R, Gryczynski I und Wiczak W M 1988 Anisotropic rotational diffusion of indole in cyclohexane studied by 2 GHz frequency-domain fluorometry *Chem. Phys. Lett.* **149** 134–9.



## 8 APPENDIX

### 8.1 Source-Code von Programmen

#### *Auswerteprogramme*

Um die Auswertung der Ergebnisse zu vereinfachen, wurde für das von Niesner geschriebene Prony-Programm eine grafische Benutzeroberfläche (GUI) in Python 2.4 geschrieben. Das Programm liest die Intensitäts-ASCII-Rohdaten ein und gibt die berechneten FLIM-Bilder ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$  und Verhältnis der Lebensdauern) als TIF-Datei aus. Zusätzlich wurde das Programm kompiliert, um systemunabhängig und flexibel zur Auswertung von Daten einsetzbar zu sein, ohne auf andere Programme angewiesen zu sein. Da zur genauen Analyse der Daten auch eine Auswertung mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus nötig ist, wurde dieser ebenfalls in Python umgesetzt. Dabei wurde auf die Analyse-Bibliotheken von Scientific Python zurückgegriffen, so dass nur die Einleseprozedur der Rohdaten und die Ausgabe der Daten direkt programmiert werden musste. Im Folgenden ist der Sourcecode für die GUI und das komplette Prony-Programm und den Levenberg-Marquardt-Algorithmus zu finden:

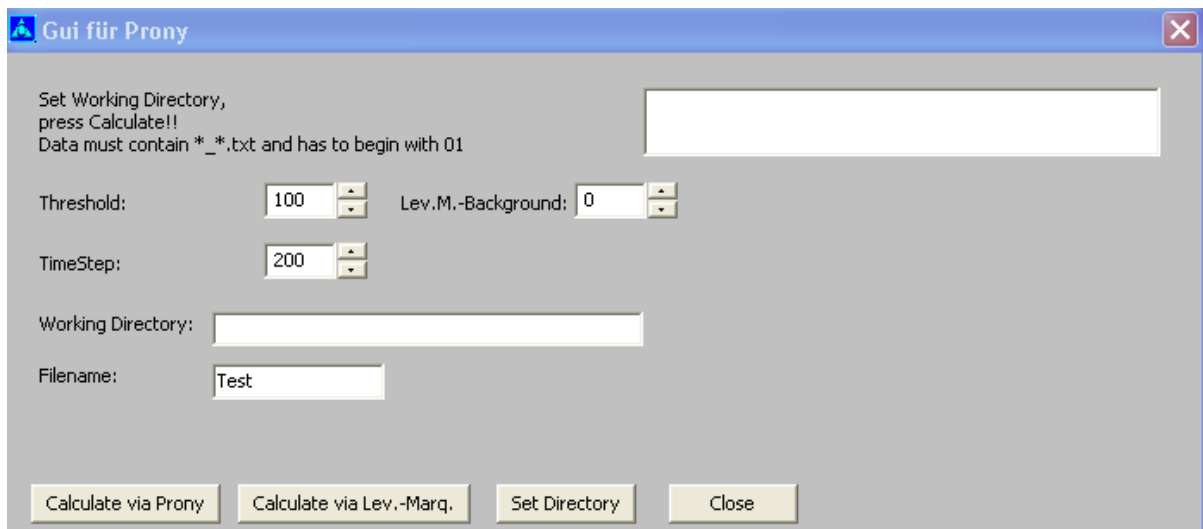


Abbildung 8-1 Screenshot der GUI für das Prony-Programm

```
# -*- coding: cp1252 -*-
#TableIO für Python 2.4
from Numeric import *
import os
from glob import *
import string
import TableIO
from Scientific.Functions.LeastSquares import *
import wx, win32api

from scipy.misc import *
import Image
#from pylab import *
```

```

class MyDialog(wx.Dialog):
    #Frame: sizeable Window

    def __init__(self, parent, id, title):

        wx.Dialog.__init__(self, parent, id, title, wx.DefaultPosition, wx.Size(700, 310))
        self.SetBackgroundColour(wx.LIGHT_GREY) # BackgroundColour
        wx.StaticText(self, -1, 'Set Working Directory,\npress Calculate!!\nData must contain *_.txt and has to begin with
01', (20,20))
        self.message = wx.TextCtrl(self, -1, '', (370,20), (300, 40)) # Textbox newOrder filename List
        wx.StaticText(self, -1, 'Threshold: ', (20, 80))
        wx.StaticText(self, -1, 'Lev.M.-Background: ', (230, 80))
        wx.StaticText(self, -1, 'TimeStep: ', (20, 115))
        wx.StaticText(self, -1, 'Working Directory: ', (20, 150))
        wx.StaticText(self, -1, 'Filename: ', (20, 180))
        self.control = wx.TextCtrl(self, -1, '', (120, 180)) # Filename
        self.control.SetValue("Test")
        #self.directory = wx.StaticText(self, -1, '', (120, 150))

        self.directory = wx.TextCtrl(self, -1, '', (120, 150),(250,20)) # Directory Textbox
        ##### Spincontrol #####
        self.sc2 = wx.SpinCtrl(self, -1, '', (150, 110), (60, -1))
        self.sc2.SetRange(0, 1000) #Timestep Value
        self.sc2.SetValue(200) #Timestep Value
        self.sc3 = wx.SpinCtrl(self, -1, '', (330, 75), (60, -1))
        self.sc3.SetRange(0, 1000) # Background for Levenberg-Marquard-Fitting
        self.sc3.SetValue(0) # Background for Levenberg-Marquard-Fitting
        self.sc = wx.SpinCtrl(self, -1, '', (150, 75), (60, -1)) #Threshold
        self.sc.SetRange(0, 1000) #Threshold - Range
        self.sc.SetValue(100) #Threshold Value

        compute_btn = wx.Button(self, 1, 'Calculate via Prony', (15, 250)) #Button for Calculation Prony
        compute_Lev = wx.Button(self, 4, 'Calculate via Lev.-Marq.', (135, 250)) #Button for Calculation Levenberg-
Marquardt
        Setdirect_btn = wx.Button(self, 2, 'Set Directory', (285, 250)) #Button for Working Directory (Time Series)
        Setdirect_btn.SetFocus()
        clear_btn = wx.Button(self, 3, 'Close', (385, 250)) #Close Button

        self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.OnCompute, id=1)
        self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.SetDir, id=2)
        self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.OnClose, id=3)
        self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.OnLev, id=4) # Levenberg Marquardt
        self.Bind(wx.EVT_CLOSE, self.OnClose)

    def OnCompute(self, event):
        threshold = self.sc.GetValue()
        dt = self.sc2.GetValue() #Timestep
        os.chdir('%s'%self.directory.GetValue()) #Changes the Working directory to the value of the TextControl
        #####
        #####Prony-Programm#####

        # #####
        # Input from the keyboard #
        # #####
        #threshold = 100#float(raw_input('Please enter the threshold > '))
        #dt = 100#float(raw_input('Please enter the time step > '))
        os.chdir('%s'%self.directory.GetValue())
        a = glob("*.txt")
        b = len(a)
        reshape1 = []
        reshape2 = []
        splitVector = []
        index = []
        newOrder = [None]*len(a)
        for i in range(len(a)):
            reshape1.append(string.replace(a[i], '_', ' ')) ##Richtiges Einlesen der Dateinamen, Ersetzen von _ durch
Space
            reshape2.append(string.replace(reshape1[i], '.', ' ')) ## Ersetzen von . durch Space
            splitVector.append(string.split(reshape2[i])) ## Splitten und anschließendes Ordnen
            index.append(string.atoi(splitVector[i][1])) ##
            newOrder[index[i]-1] = a[i] ## Dateinamen beginnen mit 01 .., Beginn mit 0: Streichen
der -1

        #print newOrder
        self.message.SetValue(str(newOrder))

        datalist=[]
        for i in range(b):
            data = TableIO.readTableAsArray(newOrder[i], '#')
            datalist.append(data)

        # #####
        # Create the time vector #
        # #####
        t = []
        for i in range(b):
            t.append(i*dt)

        # #####
        # Calculate the parameters of the biexponential fit using the Prony method #
        # Select the reasonable lifetime values #
        # #####
        time = len(datalist)
        x = len(datalist[0])
        y = len(datalist[0][0])

```

```

#
summ1_v = zeros((x,y),Float)
summ2_v = zeros((x,y),Float)
summ3_v = zeros((x,y),Float)
summ4_v = zeros((x,y),Float)
summ5_v = zeros((x,y),Float)
#
for i in range(time - 2):
    summ1_v += datalist[i + 1]*datalist[i + 1]
    summ2_v += datalist[i + 1]*datalist[i]
    summ3_v += datalist[i]*datalist[i]
    summ4_v += datalist[i + 2]*datalist[i + 1]
    summ5_v += datalist[i + 2]*datalist[i]
#
det_v = summ3_v*summ1_v - summ2_v*summ2_v
#
det_vd = det_v + equal(det_v,0.0)
#
s1 = not_equal(det_v,0.0)*((summ3_v*summ4_v - summ2_v*summ5_v)/det_vd)
s2 = not_equal(det_v,0.0)*((summ1_v*summ5_v - summ2_v*summ4_v)/det_vd)
#
delta = s1*s1 - 4.0*s2
#
delta_1 = greater(delta,0.0)*delta
delta_2 = equal(delta,0.0)
#
v1 = (-s1*(greater(delta,0.0) + delta_2) - sqrt(delta_1))/2.0
v2 = (-s1*(greater(delta,0.0) + delta_2) + sqrt(delta_1))/2.0
#
xx = []
yy = []
#
summ1_c = zeros((x,y),Float)
summ2_c = zeros((x,y),Float)
summ3_c = zeros((x,y),Float)
summ4_c = zeros((x,y),Float)
summ5_c = zeros((x,y),Float)
#
for i in range(time):
    xx.append(power(v1,i))
    yy.append(power(v2,i))
    summ1_c += xx[i]*xx[i]
    summ2_c += xx[i]*yy[i]
    summ3_c += yy[i]*yy[i]
    summ4_c += datalist[i]*xx[i]
    summ5_c += datalist[i]*yy[i]
#
det_c = summ3_c*summ1_c - summ2_c*summ2_c
#
det_cd = det_c + equal(det_c,0.0)
c1 = not_equal(det_c,0.0)*((summ4_c*summ3_c - summ2_c*summ5_c)/det_cd)
c2 = not_equal(det_c,0.0)*((summ1_c*summ5_c - summ2_c*summ4_c)/det_cd)
#
tauf1 = log(fabs(not_equal(v1,1.0)*v1 + (equal(v1,1.0) + equal(v1,0.0))*2.0))
tauf1 = -dt/(not_equal(tauf1,0.0)*tauf1 + equal(tauf1,0.0))
tauf1 = greater(datalist[0],threshold)*greater(tauf1,50.0)*less(tauf1,1000.0)*tauf1
a1 = greater(c1,0.0)*not_equal(v1,0.0)*not_equal(v1,1.0)*c1
#
tauf2 = -dt/log(fabs(not_equal(v2,1.0)*v2 + (equal(v2,1.0) + equal(v2,0.0))*2.0))
tauf2 = greater(datalist[0],threshold)*greater(tauf2,500.0)*less(tauf2,8000.0)*tauf2
a2 = greater(c2,0.0)*not_equal(v2,0.0)*not_equal(v2,1.0)*c2
#
ampli = greater(datalist[0],threshold)*a2*100.0/(a2 + equal(a2,0.0) + a1)
fraction = a2*tauf2*100.0/(a2*tauf2 + equal(a2*tauf2,0.0) + a1*tauf1)
# #####
# Output of the lifetime matrices and of the ratio matrix #
# #####
#fina = raw_input('Please enter OUTPUT FILEMANE > ')
fina = self.control.GetValue()
finame1 = fina + '-taul.txt'
finame2 = fina + '-tau2.txt'
finame3 = fina + '-ratio.txt'
finame4 = fina + '-fraction.txt'
#open(finame1,'w').write('#DaVis 6.2.4 2D-image ' + str(y) + ' ' + str(x) + ' ' + str(y) + ' 1 0 "" "pixel" 1 0 ""
"pixel" "" "counts"\n')
#open(finame2,'w').write('#DaVis 6.2.4 2D-image ' + str(y) + ' ' + str(x) + ' ' + str(y) + ' 1 0 "" "pixel" 1 0 ""
"pixel" "" "counts"\n')
#open(finame3,'w').write('#DaVis 6.2.4 2D-image ' + str(y) + ' ' + str(x) + ' ' + str(y) + ' 1 0 "" "pixel" 1 0 ""
"pixel" "" "counts"\n')
TableIO.writeArray(finame1,tauf1,'w')
TableIO.writeArray(finame2,tauf2,'w')
TableIO.writeArray(finame3,ampli,'w')
TableIO.writeArray(finame4,fraction,'w')

#imal = toimage(a1, mode='F')      ####Tifs Schreiben
#ima2 = toimage(a2, mode='F')
imtaul = toimage(tauf1, mode='F')
imtau2 = toimage(tauf2, mode='F')
imampli = toimage(ampli, mode='F')
#imal.save(fina + ' a1.tif')
#ima2.save(fina + ' a2.tif')
imtaul.save(fina + ' tau1.tif')
imtau2.save(fina + ' tau2.tif')
imampli.save(fina + ' ampli.tif')

#####

##### Ende Prony-Programm

#####

```

```
#####Levenberg-Marquardt-Routine#####
def OnLev(self, event):
    Back = self.sc3.GetValue()
    threshold = self.sc.GetValue()
    dt = self.sc2.GetValue() #Timestep
    os.chdir('%s'%self.directory.GetValue())
    a = glob('*/*.txt')
    a = glob('*_*.txt')
    b = len(a)
    reshape1 = []
    reshape2 = []
    splitVector = []
    index = []
    newOrder = [None]*len(a)
    for i in range(len(a)):
        reshape1.append(string.replace(a[i], '_', ' '))
        reshape2.append(string.replace(reshape1[i], '.', ' '))
        splitVector.append(string.split(reshape2[i]))
        index.append(string.atoi(splitVector[i][1]))
        newOrder[index[i]-1] = a[i]
    self.message.SetValue(str(newOrder))

    datalist=[]
    for i in range(b):
        data = TableIO.readTableAsArray(newOrder[i], '#')
        datalist.append(data)

# #####
# Create the time vector #
# #####
    t = []
    for i in range(b):
        t.append(i*dt)

#####
#####
# Least Squares Analysen #####
##### Levenberg-Marquardt-Methode #####
#####
#####

    x = len(datalist[0])
    y = len(datalist[0][0])

    ampli1 = zeros((x,y),Float)
    tau1 = zeros((x,y),Float)
    ampli2 = zeros((x,y),Float)
    tau2 = zeros((x,y),Float)
    ratio = zeros((x,y),Float)
    error = zeros((x,y),Float)

### Fit-Funktion Biexponentiell#####
def f2(param, t):

    return param[0]*exp(-t/param[1])+ param[2]*exp(-t/param[3])+ Back
##### Intensitätswerte #####
##### Loop für schrittweises Abarbeiten der Pixel

    for j in range(x):
        for k in range(y):
###Auslesen der Daten aus den Matrizen
            z = []
            for i in range(b):
                dataneu=datalist[i][j][k]
                z.append(dataneu)

#####Erzeugung der Tupel-Listen für Scientific Least Squares #####
            if z[0]<threshold:
                ampli1[j][k] = 0
                tau1[j][k] = 0
                ampli2[j][k] = 0
                tau2[j][k] = 0
            else:
                data_biexp = []
                for i in range(b):
                    datal=[t[i],z[i]]
                    data_biexp.append(datal)
##### Least Squares fit ### 100 Iterationen #####
                try:
                    fit = leastSquaresFit(f2, (z[0]/2,400,z[0]/2,2900), data_biexp, 100, 0.0001)

                    ampli1[j][k] = fit[0][0]
                    tau1[j][k] = fit[0][1]
                    ampli2[j][k] = fit[0][2]
                    tau2[j][k] = fit[0][3]
                    error[j][k] =fit[1]
                except:
                    ampli1[j][k] = 0
                    tau1[j][k] = 0
                    ampli2[j][k] = 0
                    tau2[j][k] = 0

    ratio=ampli2*100/(ampli1+ampli2)
    error = error/(len(datalist)-4)

#####Entfernen von Unsinnigen Matrizen#####
```



```

#taul = greater(taul,50.0)*less(taul,1000.0)*taul
#ampli1 = greater(taul,0.0)*ampli1
#tau2 = greater(tau2,500.0)*less(tau2,10000.0)*tau2
#ampli2 = greater(tau2,0.0)*ampli2

fina = self.control.GetValue()
finLM1 = fina + 'LMtaul.txt'
finLM2 = fina + 'LMtau2.txt'
finLM3 = fina + 'LMratio.txt'
finLM4 = fina + 'LMa1.txt'
finLM5 = fina + 'LMa2.txt'
finLM6 = fina + 'LMerror.txt'

TableIO.writeArray(finLM1,taul,'w')
TableIO.writeArray(finLM2,tau2,'w')
TableIO.writeArray(finLM4,ampli1,'w')
TableIO.writeArray(finLM5,ampli2,'w')
TableIO.writeArray(finLM3,ratio,'w')
TableIO.writeArray(finLM6,error,'w')

ima1 = toimage(ampli1, mode='F') #####Tifs Schreiben
ima2 = toimage(ampli2, mode='F')
imtaul = toimage(taul, mode='F')
imtau2 = toimage(tau2, mode='F')
imratio = toimage(ratio, mode='F')
imerror = toimage(error, mode='F')
ima1.save(fina + ' LMa1.tif')
ima2.save(fina + ' LMa2.tif')
imtaul.save(fina + ' LMtaul.tif')
imtau2.save(fina + ' LMtau2.tif')
imratio.save(fina + ' LMratio.tif')
imerror.save(fina + ' LMerror.tif')

#####Ende Levenberg-Marquardt#####

#####

def SetDir(self, event):
    d = wx.DirDialog(self, "Set Working Directory:", '', style=wx.DD_DEFAULT_STYLE | wx.DD_NEW_DIR_BUTTON
|wx.DD_CHANGE_DIR)
    if d.ShowModal() == wx.ID_OK:
        self.directory.SetValue('%s'%d.GetPath())
    d.Destroy()

def OnClose(self, event):
    self.Destroy()

class MyApp(wx.App):
    def OnInit(self):
        dlg = MyDialog(None, -1, 'Gui für Prony')
        dlg.exeName = win32api.GetModuleFileName(win32api.GetModuleHandle(None))
        dlg.SetIcon(wx.Icon(dlg.exeName + ".ico", wx.BITMAP_TYPE_ICO))
        #dlg.SetIcon(wx.Icon('aquaflagged.ico', wx.BITMAP_TYPE_ICO))
        dlg.Show(True)
        dlg.Centre()
        return True
app = MyApp(0)
app.MainLoop()

```

### Global Fitting in Python

Wie oben beschrieben, wurden verschiedene Ansätze zur Auswertung genutzt. Auch für die globale Auswertung wurde ein Programm in Python 2.4 implementiert.

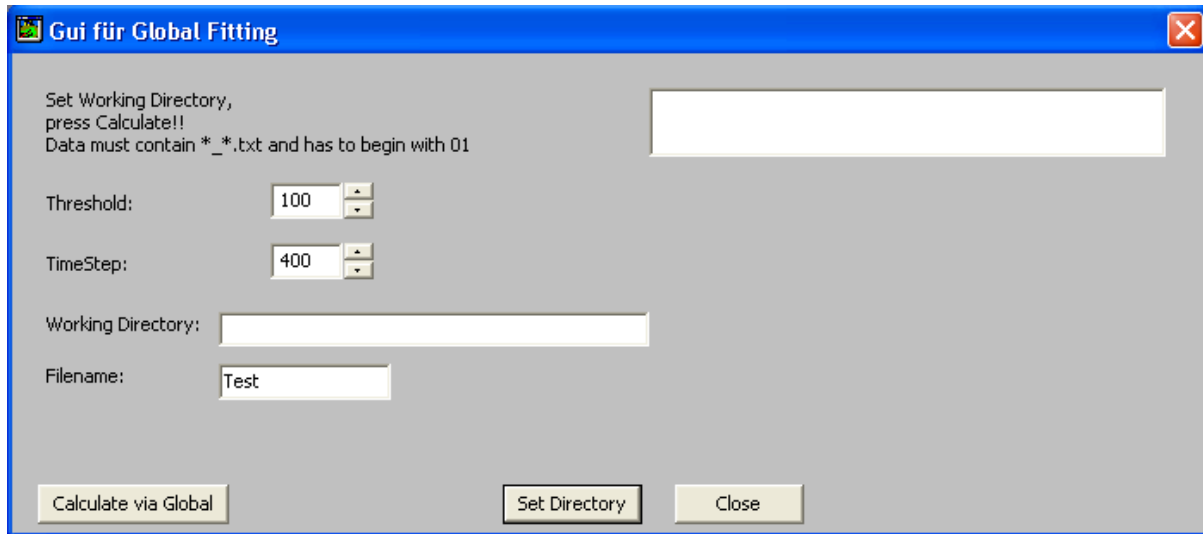


Abbildung 8-2 Screenshot der GUI des Global Fitting-Programms

```
# -*- coding: cp1252 -*-
#based on Prony-Gui
# -*- coding: cp1252 -*-
#TableIO für Python 2.4
from numpy import *
import os
from glob import *
import string
import TableIO
from Scientific.Functions.LeastSquares import *
import wx, win32api

##Libs for Image
from scipy.misc import *
import Image

class MyDialog(wx.Dialog):
    #Frame: sizeable Window
    def __init__(self, parent, id, title):
        wx.Dialog.__init__(self, parent, id, title, wx.DefaultPosition, wx.Size(700, 310))
        self.SetBackgroundColour(wx.LIGHT_GREY) # BackgroundColour
        wx.StaticText(self, -1, 'Set Working Directory,\npress Calculate!!\nData must contain *_.txt and has to begin with 01', (20,20))
        self.message = wx.TextCtrl(self, -1, '', (370,20), (300, 40)) # Textbox newOrder filename List
        wx.StaticText(self, -1, 'Threshold: ', (20, 80))
        #wx.StaticText(self, -1, 'Lev.M.-Background: ', (230, 80))
        wx.StaticText(self, -1, 'TimeStep: ', (20, 115))
        wx.StaticText(self, -1, 'Working Directory: ', (20, 150))
        wx.StaticText(self, -1, 'Filename: ', (20, 180))
        self.control = wx.TextCtrl(self, -1, '', (120, 180)) # Filename
        self.control.SetValue("Test")
        #self.directory = wx.StaticText(self, -1, '', (120, 150))

        self.directory = wx.TextCtrl(self, -1, '', (120, 150), (250,20)) # Directory Textbox
        ##### Spincontrol #####
        self.sc2 = wx.SpinCtrl(self, -1, '', (150, 110), (60, -1))
        self.sc2.SetRange(0, 1000) #Timestep Value
        self.sc2.SetValue(400) #Timestep Value
        #self.sc3 = wx.SpinCtrl(self, -1, '', (330, 75), (60, -1))
        #self.sc3.SetRange(0, 1000) # Background for Levenberg-Marquard-Fitting
```

```

self.sc3.SetValue(0) # Background for Levenberg-Marquardt-Fitting
self.sc = wx.SpinCtrl(self, -1, '', (150, 75), (60, -1)) #Threshold
self.sc.SetRange(0, 1000) #Threshold - Range
self.sc.SetValue(100) #Threshold Value

compute_btn = wx.Button(self, 1, 'Calculate via Global', (15, 250)) #Button for Calculation Prony
#compute_Lev = wx.Button(self, 4, 'Calculate via Global Fit.', (135, 250)) #Button for Calculation Levenberg-
Marquardt
Setdirect_btn = wx.Button(self, 2, 'Set Directory', (285, 250)) #Button for Working Directory (Time Series)
Setdirect_btn.SetFocus()
clear_btn = wx.Button(self, 3, 'Close', (385, 250)) #Close Button

self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.OnGlobal, id=1)
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.SetDir, id=2)
self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.OnClose, id=3)
#self.Bind(wx.EVT_BUTTON, self.OnLev, id=4) # Levenberg Marquardt
self.Bind(wx.EVT_CLOSE, self.OnClose)

def OnGlobal(self, event):
    threshold = self.sc.GetValue()
    dt = self.sc2.GetValue() #Timestep
    os.chdir('%s'%self.directory.GetValue()) #Changes the Working directory to the value of the TextControl

    a = glob("*.txt")
    b = len(a)
    reshape1 = []
    reshape2 = []
    splitVector = []
    index = []
    newOrder = [None]*len(a)
    for i in range(len(a)):
        reshape1.append(string.replace(a[i], '_', ' ')) ##Richtiges Einlesen der Dateinamen, Ersetzen von _ durch
Space
        reshape2.append(string.replace(reshape1[i], '.', ' ')) ## Ersetzen von . durch Space
        splitVector.append(string.split(reshape2[i])) ## Splitten und anschließendes Ordnen
        index.append(string.atoi(splitVector[i][1])) ##
        newOrder[index[i]-1] = a[i] ## Dateinamen beginnen mit 01 ..., Beginn mit 0: Streichen
der -1

    #print newOrder
    #self.message.SetValue(str(newOrder))

    datalist=[]
    for i in range(b):
        data = TableIO.readTableAsArray(newOrder[i], '#')
        datalist.append(data)

    x = len(datalist[0])
    y = len(datalist[0][0])

    t = []
    for i in range(b):
        t.append(i*dt)

    #Threshold matrices-List
    Maske = zeros((x,y))

    for j in range(x):
        for k in range(y):
            if datalist[0][j][k] < threshold:
                Maske[j][k]= 0
            else:
                Maske[j][k]=1
    masklist=[]
    for i in range(b):
        test = multiply(Maske, datalist[i])
        masklist.append(test)
    #Summation#####
    liste = []
    for i in range(b):

```

```

        neu = masklist[i].sum()
        liste.append(neu)
    print liste
    #####Global Fitting#####
    def f2(param, t):

        return param[0]*exp(-t/param[1])+ param[2]*exp(-t/param[3])

    data_biexp = []
    for i in range(b):
        datal=[t[i],liste[i]]
        data_biexp.append(datal)

    fit = leastSquaresFit(f2, (liste[0]/2,400,liste[0]/2,2900), data_biexp, 100, 0.0001)

    #print fit[0][0] # a1
    tau1 = fit[0][1] # tau1
    #print fit[0][2] # a2
    tau2 = fit[0][3] # tau2

    #####Minimierung von Summe (Model-Intwert)^2 Linear least-squares

    #####Definition der Summen der Lösung
    #####Tau1 * Pixelwert
    array3 = zeros((x, y), float)
    for i in range(b):
        if i < b:
            array3 = array3 + masklist[i]*exp(-t[i]/tau1)
    #print array3
    # ##### Tau2 * Pixelwert
    array4 = zeros((x, y), float)
    for i in range(b):
        if i < b:
            array4 = array4 + masklist[i]*exp(-t[i]/tau2)

    #Summe 2* tau1
    e1=0
    for i in range(b):
        if i < b:
            e1 = e1+ exp(-2*t[i]/tau1)

    #print e1

    #Summe 2*tau2
    e2=0
    for i in range(b):
        if i < b:
            e2 = e2+ exp(-2*t[i]/tau2)
    #print e2

    em=0
    for i in range(b):
        if i < b:
            em = em + exp(-t[i]*(1/tau1+1/tau2))

    #print em
    ##### Lösung der Gleichungen #####

    ampl1 = zeros((x, y), float)
    ampl2 = zeros((x, y), float)

    ampl1 = (array4*em-array3*e2)/(em*em-e1*e2)

    ampl2 = (array3*em-array4*e1)/(em*em-e1*e2)
    ratio = 100*ampl2/(ampl1+ampl2)

    ### Delete
    ampl1 = greater(ampl1,0.0)*ampl1

```

```

    ampl2 = greater(ampl2,0.0)*ampl2
    ratio = greater(ampl1,0.0)*ratio

    ###Writing###
    self.message.SetValue("taul :"+str(int(taul))+ " tau2 :"+str(int(tau2)))

    fina = self.control.GetValue()
    finampl1 = fina + str(int(taul)) + ' Global.txt'
    finampl2 = fina + str(int(tau2)) + ' Globa2.txt'
    finratio = fina + ' Globratio.txt'

    TableIO.writeArray(finampl1,ampl1,'w')
    TableIO.writeArray(finampl2,ampl2,'w')
    TableIO.writeArray(finratio,ratio,'w')

    ima1 = toimage(ampl1, mode='F')      ###Tifs Schreiben
    ima2 = toimage(ampl2, mode='F')
    imratio = toimage(ratio, mode='F')
    ima1.save(fina +str(int(taul))+ ' Global.tif')
    ima2.save(fina +str(int(tau2))+ ' Globa2.tif')
    imratio.save(fina + ' Globratio.tif')

    #print ampl1
    #print ampl2
    def SetDir(self, event):
        d = wx.DirDialog(self, "Set Working Directory:", '', style=wx.DD_DEFAULT_STYLE | wx.DD_NEW_DIR_BUTTON
|wx.DD_CHANGE_DIR)
        if d.ShowModal() == wx.ID_OK:
            self.directory.SetValue('%s'%d.GetPath())
            d.Destroy()

    def OnClose(self, event):
        self.Destroy()

class MyApp(wx.App):
    def OnInit(self):
        dlg = MyDialog(None, -1, 'Gui für Global Fitting')
        dlg.exeName = win32api.GetModuleFileName(win32api.GetModuleHandle(None))
        dlg.SetIcon(wx.Icon(dlg.exeName + ".ico", wx.BITMAP_TYPE_ICO))
        #dlg.SetIcon(wx.Icon('aquaflagged.ico', wx.BITMAP_TYPE_ICO))
        dlg.Show(True)
        dlg.Centre()
        return True
app = MyApp(0)
app.MainLoop()

```

### *Motorsteuerung für Z-Achse Zweiphotonensystem (biologische Messungen)*

Um mit dem Davis-Programm von LaVision direkt 3D-Bilderserien in definierten  $\mu\text{m}$ -Abständen aufnehmen zu können, wurde eine Steuerung für einen bestehenden Z-Achsenmotor von Physik-Instrumente in der Programmiersprache Davis CL implementiert. Der Motorcontroller wird über RS232 vom Programm angesteuert. Sie ist der Programmiersprache C sehr ähnlich. Auf diesem Weg kann das Programm Davis an den Nutzer angepasst werden.

```

// Bedienungsfenster für Z-Motor von PI in Verbindung mit dem
//DC-Motor Controller Mercury von PI, wird über RS232 angesteuert )
// zur Initialisierung des Controllers nach Power-Reset ist es nötig,
//Mercuy-Software einmal zu starten, bevor man das Macro startet

void DIALOGPIMOVE()
{
    // Created by DaVis 6.2.4 Fri Oct 27 17:52:49 2006. Do not modify this macro!

```

```

DialogAttributes = 520;          // dialog stays invisible during creation (up to ShowDialog())
int id = Dialog( "PIMOVE", 73, 233, 416, 195, "PI Z-Drive" );
int idd;
AddItem( id, ++idd, 4, 300, 158, 100, 25, "Take Image", "EventTake_Image(100)" );
AddItem( id, ++idd, 4, 300, 130, 100, 25, "Take ImageMPM", "EventTake_Image(200)" );
AddItem( id, ++idd, 4, 12, 130, 29, 24, "ON", "EventMove(100)" );
AddItem( id, ++idd, 4, 44, 130, 31, 24, "OFF", "EventMove(200)" );
AddItem( id, ++idd, 15, 4, 3, 0, 0, "C:\\Programme\\davis6.2\\CL\\bmp\\up.bmp", "EventMove(500)" );
AddItem( id, ++idd, 4, 11, 157, 91, 24, "Tell Position", "EventMove(300)" );
AddItem( id, ++idd, 4, 106, 157, 96, 24, "Define Home", "EventMove(400)" );
AddItem( id, ++idd, 15, 4, 40, 0, 0, "C:\\Programme\\davis6.2\\CL\\bmp\\down.bmp", "EventMove(600)" );
AddItem( id, ++idd, 8, 85, 39, 45, 20, "", "NumberSteps" ); // Anzahl an Steps die sich der Motor bewegen soll
AddItem( id, ++idd, 8, 360, 71, 35, 20, "", "NumberImages" ); //Zahl an Bildern, die aufgenommen werden
AddItem( id, ++idd, 5, 260, 70, 100, 25, "Number of Images:", "" );
AddItem( id, ++idd, 5, 45, 22, 37, 30, "Move", "" ); //Static Text
AddItem( id, ++idd, 5, 45, 45, 37, 30, "Steps", "" ); //Static Text
AddItem( id, ++idd, 4, 300, 100, 100, 25, "Image Loop", "EventMove(700)" ); // Button Z-Stack automatisch aufnehmen
AddItem( id, ++idd, 7, 225, 100, 60, 60, "Up\\nDown", "UPDOWN" );
ShowDialog(id);
}

//Globale Variablen:

int UPDOWN;          // Variable für Radiobuttons Up and Down
static string NumberSteps = "100"; //Nummer an internen Counts, die sich die Stage bewegt. 1 Count = 8.4 nm
static int NumberImages = 5; // Nummer an Bildern für die automatische Bildaufnahme --> Image Loop

void GetImage() // verändertes Makro von Davis --> ursprünglich GetSingleImage()

{

    int x = Buffer;

    if (SetupAcquisition()) return;          // Initialisierung der Kamera etc., voreingestellte Exp. Time wird
übernommen
    int n = GetNumberOfImages();             // number of buffers used by TakeImage()
    int k;
    if ( AcqAction )
    {
        ScanActionCount = 1;
        ActionInitAcq(1);
        ActionBeforeAcq();
    }
    TakeImage( x ); // Bild wird in Buffer x abgespeichert

    if ( AcqAction ) ActionDuringAcq(0);
    if ( n > 0 && AcqShow )
        for ( int i = n-1; i >= 0; i-- )

        iImage++;

                                                                    // increase image counter

    if ( AcqAction ) ActionAfterAcq();
    EndAcquisition();
    BufferName(x, x*NumberSteps-NumberSteps);
    Show(x);
    //StoreBuffer(x,x);

    //Buffer = theBufferNumber;

}

void TakeImageMPM() // Makro zur Aufnahme von Bildern innerhalb des MPM-Moduls, funktioniert NUR, wenn das MPM-Modul
gestartet wurde
{
    int y = Buffer;
    mpmSetupAcquisition();
    TakeImage(y);
    if (BackgroundSubAdv)

```

```

        AdvBackgroundSubPicoStar(Buffer);
        if (StrLen(lw_clCommandAtEnd)) CL_command(lw_clCommandAtEnd);
        mpmEndAcquisition();
        lwShowDlg(Buffer);
        if (mpmPlotViewFlagAutoUpdate)
            if (mpmPlotView != mpmPLOTVIEW_Z) mpmPlot_ViewUpdate(mpmPlotView,1);
        BufferName(y, y*NumberSteps-NumberSteps);
    }

void EventTake_Image(int id)    // Event Handler für 2 Buttons
{
    int id = GetDialogId ("PIMOVE");
    switch (id){
        case 100 : GetImage();
        break;
        case 200 : TakeImageMPM();
        break;
    }
}

void EventMove(int id)    // EventHandler für alle anderen Buttons
{
    int id = GetDialogId ("PIMOVE");
    ApplyDialog(id);

    switch (id){
        case 1:
            ApplyItem(id, id);
            break;
        case -1:    // Drücke Return, um die Variablen abspeichern, z.B. Number of Steps
            ApplyItem(id, id);
            break;
        case 100 :
            SendCom(3,"01",5,13);
            SendCom(3, "mn\r", 5, 13); // Motor an
            break;
        case 200 : SendCom(3, "mf\r", 5, 13); // Motor aus
            break;
        case 300 : SendCom(3, "",5, 13); // Tell Position ' entspricht tp\r
            StatusText("result: "+SendCom(3,"",5,13));
            break;
        case 400 : SendCom(3, "dh\r",5, 13);    // Define Home
            break;
        case 500 : SendCom(3, "mr"+NumberSteps+"\r",5, 13); // Move Relative UP
            do
            {
                SendCom(3,"?",5,13);    // ? entspricht te\r Tell Error ( Abstand vom Ziel)
                StatusText("result: "+SendCom(3,"td\r",5,13));
            } while (SendCom(3,"?",5,13) != "E:+0000000000");
            StatusText("result: "+SendCom(3,"",5,13));
            Buffer = Buffer+1;    // Nach der Bewegung wird der Aktive Buffer, um eins erhöht
            break;
        case 600 : SendCom(3,"mr"+"-"+NumberSteps+"\r",5, 13); // Move Relative Down
            do
            {
                SendCom(3,"?",5,13);
                StatusText("result: "+SendCom(3,"td\r",5,13));
            } while (SendCom(3,"?",5,13) != "E:+0000000000");
            StatusText("result: "+SendCom(3,"",5,13));
            Buffer = Buffer+1;
            break;
        case 700 : // Image Loop
            int u;
            for (u=1; u<= NumberImages; u++)

            {
                TakeImageMPM();
                if (u != NumberImages)
                    Loop();
            }
    }
}

```

```
        break;
    }

}

void Loop()
{
    if (UPDOWN == 1)
    {SendCom(3, "mr"+"-"+NumberSteps+"\r",5, 13);
    do
        // Loop, um die Position des Tisches zu überwachen
        {   SendCom(3,"?",5,13);    // die Position des Tisches erscheint im StatusText
            StatusText("result: "+SendCom(3,"td\r",5,13));
        } while (SendCom(3,"?",5,13) != "E:+0000000000");
        StatusText("result: "+SendCom(3,"'",5,13));

    Buffer = Buffer+1;}
    else {SendCom(3, "mr"+NumberSteps+"\r",5, 13);
    do
        {   SendCom(3,"?",5,13);
            StatusText("result: "+SendCom(3,"td\r",5,13));
        } while (SendCom(3,"?",5,13) != "E:+0000000000");
        StatusText("result: "+SendCom(3,"'",5,13));

    Buffer = Buffer+1;}
}
```



## 8.2 Tensorformalismus Vasyutinskii

### *Komponenten des irreduzierbaren Zweiphotonentensors*

Die polaren Komponenten in der Tensorschreibweise zeigen eine Wellenlängenabhängigkeit. Für die Berechnung der M-Parameter wurde angenommen, dass die Wellenlängen der Anregungsphotonen bei 800 und 400 nm liegen und nur ein intermediärer Zustand bei 266 nm zum Tensor beiträgt. Für die Erklärung aller einzelnen Variablen sei auf die Literatur verwiesen [78].

$$S_{00} = -\frac{1}{\sqrt{3}} \sum_e \left( \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle + \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle + \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle \right) \\ \times \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right).$$

$$S_{10} = -\frac{i}{\sqrt{2}} \sum_e \left( \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle \right) \\ \times \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} - \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right).$$

$$S_{1\pm 1} = -\frac{1}{2} \sum_e \left[ \left( \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle \right) \right. \\ \left. \pm i \left( \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle \right) \right] \\ \times \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} - \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right).$$

$$S_{20} = \frac{1}{\sqrt{6}} \sum_e \left( 2 \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle \right) \\ \times \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right).$$

$$S_{2\pm 1} = \mp \frac{1}{2} \sum_e \left[ \left( \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle + \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle \right) \right. \\ \left. \pm i \left( \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle + \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle \right) \right] \\ \times \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right).$$

$$S_{2\pm 2} = \frac{1}{2} \sum_e \left[ \left( \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle \right) \right. \\ \left. \pm i \left( \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle + \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle \right) \right] \\ \times \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right).$$

*M-Parameter (nullte Ordnung)*

$$\begin{aligned}
 M_0(0, 0) &= \sum_{q_3} |\langle n_g | \hat{d}_{q_3} | n_f \rangle|^2 |S_{00}|^2 \\
 &= \frac{1}{3} \left( |\langle n_g | \hat{d}_x | n_f \rangle|^2 + |\langle n_g | \hat{d}_y | n_f \rangle|^2 + |\langle n_g | \hat{d}_z | n_f \rangle|^2 \right) \\
 &\quad \times \left| \sum_e \left[ \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle + \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle + \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle \right] \right. \\
 &\quad \left. \times \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right) \right|^2.
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 M_0(1, 1) &= \frac{1}{\sqrt{3}} \sum_{q_3} |\langle n_g | \hat{d}_{q_3} | n_f \rangle|^2 \left( |S_{10}|^2 + 2|S_{11}|^2 \right) \\
 &= \frac{1}{2\sqrt{3}} \left( |\langle n_g | \hat{d}_x | n_f \rangle|^2 + |\langle n_g | \hat{d}_y | n_f \rangle|^2 + |\langle n_g | \hat{d}_z | n_f \rangle|^2 \right) \\
 &\quad \times \left[ \left| \sum_e \left( \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle \right) \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} - \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right) \right|^2 \right. \\
 &\quad + \left| \sum_e \left( \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle \right) \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} - \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right) \right|^2 \\
 &\quad \left. + \left| \sum_e \left( \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle \right) \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} - \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right) \right|^2 \right]
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 M_0(2, 2) &= \frac{1}{\sqrt{5}} \sum_{q_3} |\langle n_g | \hat{d}_{q_3} | n_f \rangle|^2 \left( |S_{20}|^2 + 2|S_{21}|^2 + 2|S_{22}|^2 \right) \\
 &= \frac{1}{\sqrt{5}} \left( |\langle n_g | \hat{d}_x | n_f \rangle|^2 + |\langle n_g | \hat{d}_y | n_f \rangle|^2 + |\langle n_g | \hat{d}_z | n_f \rangle|^2 \right) \\
 &\quad \times \left[ \frac{1}{6} \left| \sum_e \left( 2\langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle \right) \right. \right. \\
 &\quad \left. \times \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right) \right|^2 \\
 &\quad + \frac{1}{2} \left| \sum_e \left( \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle + \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle \right) \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right) \right|^2 \\
 &\quad + \frac{1}{2} \left| \sum_e \left( \langle n_f | \hat{d}_z | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle + \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_z | n_i \rangle \right) \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right) \right|^2 \\
 &\quad + \frac{1}{2} \left| \sum_e \left( \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle - \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle \right) \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right) \right|^2 \\
 &\quad \left. + \frac{1}{2} \left| \sum_e \left( \langle n_f | \hat{d}_x | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_y | n_i \rangle + \langle n_f | \hat{d}_y | n_e \rangle \langle n_e | \hat{d}_x | n_i \rangle \right) \left( \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\Delta_{ei} - \hbar\omega_2} \right) \right|^2 \right]
 \end{aligned}$$

*Gesamtintensität*

$$\begin{aligned}
I_{\parallel} &= \frac{C}{9} \left[ M_0(0, 0) + \frac{2}{\sqrt{5}} M_0(2, 2) \right] \\
I_{\perp} &= \frac{C}{9} \left[ \frac{\sqrt{3}}{2} M_0(1, 1) + \frac{3}{2\sqrt{5}} M_0(2, 2) \right] \\
I_{cs} &= \frac{C}{3\sqrt{5}} M_0(2, 2) \\
I_{co} &= \frac{C}{9} \left[ M_0(0, 0) + \frac{\sqrt{3}}{2} M_0(1, 1) + \frac{1}{2\sqrt{5}} M_0(2, 2) \right]
\end{aligned}$$

*M-Parameter (zweiter Ordnung)*

$$\begin{aligned}
M_2(2, 0) &= -\sqrt{3} ([\mathbf{F}^* \otimes \mathbf{F}']_2 \cdot [\mathbf{S}_0^* \otimes \mathbf{S}_2]_2) = -\sqrt{3} \sum_{\bar{\kappa}} [\mathbf{F}^* \otimes \mathbf{F}]_{2\bar{\kappa}} ([\mathbf{S}_0^* \otimes \mathbf{S}_2]_{2\bar{\kappa}})^* \\
&= -\frac{1}{\sqrt{2}} \left( 2|\langle n_g | \hat{d}_z | n_f \rangle|^2 - |\langle n_g | \hat{d}_x | n_f \rangle|^2 - |\langle n_g | \hat{d}_y | n_f \rangle|^2 \right) S_{00} (S_{20})^* \\
&\quad - 2\sqrt{6} \operatorname{Re} (F_0 F_1^* S_{00} S_{21}) - 2\sqrt{3} \operatorname{Re} (F_1^* F_1^* S_{00} (S_{22})) .
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
M_2(2, 1) &= -\sqrt{3} ([\mathbf{F}^* \otimes \mathbf{F}']_2 \cdot [\mathbf{S}_2^* \otimes \mathbf{S}_1]_2) = -\sqrt{3} \sum_{\delta} [\mathbf{F}^* \otimes \mathbf{F}]_{2\delta} ([\mathbf{S}_2^* \otimes \mathbf{S}_1]_{2\delta})^* \\
&= -\left( 2|\langle n_g | \hat{d}_z | n_f \rangle|^2 - |\langle n_g | \hat{d}_x | n_f \rangle|^2 - |\langle n_g | \hat{d}_y | n_f \rangle|^2 \right) \operatorname{Re} (S_{21} S_{11}^*) \\
&\quad + 2 \operatorname{Re} [F_{10} F_{11} (\sqrt{3} S_{20} S_{11} - S_{21} S_{10})] - 2 \operatorname{Re} [F_{11} F_{11} (\sqrt{2} S_{22} S_{10} - S_{21} S_{11})]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
M_2(2, 2) &= -\sqrt{3} ([\mathbf{F}^* \otimes \mathbf{F}']_2 \cdot [\mathbf{S}_2^* \otimes \mathbf{S}_2]_2) = -\sqrt{3} \sum_{\bar{\kappa}} [\mathbf{F}^* \otimes \mathbf{F}]_{2\bar{\kappa}} ([\mathbf{S}_2^* \otimes \mathbf{S}_2]_{2\bar{\kappa}})^* \\
&= \frac{1}{\sqrt{7}} \left( 2|\langle n_g | \hat{d}_z | n_f \rangle|^2 - |\langle n_g | \hat{d}_x | n_f \rangle|^2 - |\langle n_g | \hat{d}_y | n_f \rangle|^2 \right) (|S_{20}|^2 + |S_{21}|^2 - 2|S_{22}|^2) \\
&\quad + \frac{4\sqrt{3}}{\sqrt{7}} \operatorname{Re} [F_{10} F_{11} (S_{20} S_{21}^* + \sqrt{6} S_{21} S_{22}^*)] \\
&\quad - \frac{2\sqrt{3}}{\sqrt{7}} \operatorname{Re} [F_{11} F_{11} (\sqrt{2} S_{22}^* S_{20} - \sqrt{3} S_{21}^* S_{21})] .
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
M_2(1, 1) &= -\sqrt{3} ([\mathbf{F}^* \otimes \mathbf{F}']_2 \cdot [\mathbf{S}_1^* \otimes \mathbf{S}_1]_2) = -\sqrt{3} \sum_{\delta} [\mathbf{F}^* \otimes \mathbf{F}]_{2\delta} ([\mathbf{S}_1^* \otimes \mathbf{S}_1]_{2\delta})^* \\
&= -\frac{1}{\sqrt{3}} \left( 2|\langle n_g | \hat{d}_z | n_f \rangle|^2 - |\langle n_g | \hat{d}_x | n_f \rangle|^2 - |\langle n_g | \hat{d}_y | n_f \rangle|^2 \right) (|S_{10}|^2 - |S_{11}|^2) \\
&\quad - 4\sqrt{3} \operatorname{Re} [F_{10} F_{11} S_{10} S_{11}^*] \\
&\quad + 2\sqrt{3} \operatorname{Re} [F_{11} F_{11} S_{11}^* S_{11}^*] .
\end{aligned}$$

*Vereinfachte M-Parameter für Tensorelemente  $xz, zx, yz, zy = 0$*

Die M-Parameter lassen sich vereinfachen, wenn bestimmte Elemente des Zweiphotonen-tensors Null sind.

$$M_0(0, 0) = (d_z^2 + d_x^2 + d_y^2) |S_{00}|^2 e^{-\Gamma_0 t}$$

$$M_0(1, 1) = \frac{1}{\sqrt{3}} (d_z^2 + d_x^2 + d_y^2) |S_{10}|^2 e^{-\Gamma_0 t}$$

$$M_0(2, 2) = \frac{1}{\sqrt{5}} (d_z^2 + d_x^2 + d_y^2) (|S_{20}|^2 + 2|S_{22}|^2) e^{-\Gamma_0 t}$$

$$\begin{aligned}
M_2(2, 0) &= -\frac{1}{\sqrt{2}} (2d_z^2 - d_x^2 - d_y^2) S_{00} (S_{20})^* e^{-\Gamma_{20} t} \\
&\quad - \sqrt{3} \operatorname{Re} [(d_x - id_y)^2 S_{00} (S_{22})] e^{-\Gamma_{22} t}
\end{aligned}$$

$$M_2(2, 1) = -\sqrt{2} \operatorname{Re} [(d_x + id_y)^2 S_{22} S_{10}] e^{-\Gamma_{22} t}$$

$$\begin{aligned}
M_2(2, 2) &= \frac{1}{\sqrt{7}} (2d_z^2 - d_x^2 - d_y^2) (|S_{20}|^2 - 2|S_{22}|^2) e^{-\Gamma_{20} t} \\
&\quad - 2\frac{\sqrt{6}}{\sqrt{7}} \operatorname{Re} [(d_x + id_y)^2 S_{22}^* S_{20}] e^{-\Gamma_{22} t}
\end{aligned}$$

$$M_2(1, 1) = \frac{1}{\sqrt{3}} (2d_z^2 - d_x^2 - d_y^2) |S_{10}|^2 e^{-\Gamma_{20} t}$$

### Beispielrechnung

Anhand einer Beispielrechnung wird gezeigt, wie die Werte der M-Parameter für einen Übergang berechnet werden können:

Für einen vereinfachten Tensor  $S$  mit nur einem Element, welches ungleich Null ist (hier  $S_{xx}$ ) und einem Fluoreszenzdipolmoment  $\vec{l}$ , was parallel zu der Hauptachse des Tensors ( $x^2$ ) gilt:

$$S = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}; \quad \text{Fluoreszenzdipolmoment } \vec{l}: \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (8.1)$$

Zur Berechnung können die vereinfachten Gleichungen für die M-Parameter herangezogen werden. Es wird ferner angenommen, dass es nur einen intermediären Zustand (Abstand des intermediären Zustands vom Grundzustand:  $\hbar\omega_e$ ,  $\omega_e = c \cdot 2\pi / 266 \text{ nm}$ ) gibt und dass die Energien der Photonen bei  $\hbar\omega_1$  mit  $\omega_1 = c \cdot 2\pi / 400 \text{ nm}$  und  $\hbar\omega_2$  mit  $\omega_2 = c / 2\pi \cdot 800 \text{ nm}$  liegen. Die Zeitabhängigkeit der Parameter wird aus Übersichtlichkeitsgründen weggelassen. Für die polaren Komponenten der Tensoren ( $S_{00}$  etc.) gilt dann:

$$S_{00} = -\frac{1}{\sqrt{3}}(1 + 0 + 0) \cdot \left( \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_2} \right) \quad (8.2)$$

$$S_{10} = -\frac{i}{\sqrt{2}} \cdot (0 - 0) \left( \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_1} - \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_2} \right) = 0 \quad (8.3)$$

$$S_{1\pm 1} = -\frac{1}{2}[(0 - 0) \pm i(0 - 0)] \cdot \left( \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_2} \right) = 0 \quad (8.4)$$

$$S_{20} = \frac{1}{\sqrt{6}} \cdot [2 \cdot 0 - 1 - 0] \left( \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_2} \right) \quad (8.5)$$

$$S_{2\pm 1} = \mp \frac{1}{2} \cdot [(0 + 0) \pm i(0 + 0)] \left( \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_2} \right) = 0 \quad (8.6)$$

$$S_{2\pm 2} = \frac{1}{\sqrt{2}} \cdot [(1 - 0) \pm i(0 + 0)] \left( \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_1} + \frac{1}{\hbar\omega_e - \hbar\omega_2} \right) \quad (8.7)$$

Für die vereinfachten M-Parameter gilt:

$$M_0(0,0) = |\vec{l}|^2 |S_{00}|^2 = (1^2 + 0^2 + 0^2) |S_{00}|^2 \quad (8.8)$$

$$M_0(1,1) = \frac{1}{\sqrt{3}} \cdot |\vec{l}|^2 |S_{10}|^2 = (1^2 + 0^2 + 0^2) |S_{10}|^2 = 0 \quad (8.9)$$

$$M_0(2,2) = \frac{1}{\sqrt{5}} |\vec{l}|^2 (|S_{20}| + 2|S_{22}|^2) = (1^2 + 0^2 + 0^2) (|S_{20}|^2 + 2|S_{22}|^2) \quad (8.10)$$

$$M_2(0,2) = -\frac{1}{\sqrt{2}} \cdot (2 \cdot 0^2 - 1^2 - 0^2) S_{00}(S_{20})^* - \sqrt{3} \operatorname{Re}[(1 - i0)^2 S_{00}(S_{22})] \quad (8.11)$$

$$M_2(1,2) = -\sqrt{2} \cdot \operatorname{Re}[(1 + i0)^2 S_{22}(S_{10})] = 0 \quad (8.12)$$

$$M_2(2,2) = \frac{1}{\sqrt{7}} \cdot (2 \cdot 0^2 - 1^2 - 0^2) (|S_{20}|^2 - 2|S_{22}|^2) \quad (8.13)$$

$$- 2 \frac{\sqrt{6}}{\sqrt{7}} \operatorname{Re}[(1 + i0)^2 S_{20}(S_{22})^*]$$

$$M_2(1,1) = \sqrt{3} \cdot (2 \cdot 0^2 - 1^2 - 0^2) |S_{10}|^2 = 0 \quad (8.14)$$

Bei diesem vereinfachten Tensor haben drei der Parameter den Wert Null, aufgrund der Symmetrie des Tensors ( $S_{10}=0$ ). Mit allen anderen Parametern können gemäß den Formeln in Abschnitt 2.5.1 und 4.9.2 Anisotropien und Intensitäten berechnet werden. Hier sei noch einmal darauf hingewiesen, dass  $M_0(1,1)$ ,  $M_2(1,1)$ ,  $M_2(1,2)$  bei einer Zweiphotonenanregung mit Photonen gleicher oder ähnlicher Wellenlänge den Wert Null annehmen, da dann  $S_{10}$  immer null ist.

## Danksagung

Ich danke meinem Mentor Herrn Professor Dr. Gericke für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung, die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und hilfreichen Diskussionen. Mein Dank gebührt meinen Arbeitskollegen, insbesondere Stefan Quentmeier und Jan-Eric Ehlers für immer wieder interessante Gespräche und Anregungen. Der Arbeitsgruppe AG Gericke danke ich für das freundliche und geistig anregende Arbeitsklima. Den Studien – und Bachelorarbeitern sei für die Mitarbeit bei Experimenten gedankt. Mein Dank geht auch an die Kooperationspartner der AG Rustenbeck vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU Braunschweig für Unterstützung bei Messungen in Zellen und Oleg Vasyutinskii und Mitarbeitern vom Ioffe-Institut, St. Petersburg für die Vermittlung der theoretischen Basis der Anisotropiemessungen. Abschließend möchte ich meine Eltern für moralische und finanzielle Hilfe in allen Lebenslagen danken.

Stefan Denicke